

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Wirkmechanismen neuer Therapeutika bei
wachstumshormonproduzierendem Hypophysentumor –
experimentelle Studie im Rattenmodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sara Harperscheid, geb. Fleck
aus Trier

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Harald Schneider
Prof. Dr. Susanne Bechtold- Dalla Pazza

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Martin Bidlingmaier
PD Dr. med. vet., Dr. habil. med. Maximilian Bielohuby

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2018

*Für meine Großeltern,
Heinrich und Maria Fleck*



Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.	1
1.1 Akromegalie.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologischer Hintergrund	1
1.2 Klinik	1
1.2.1 Pathogenese	1
1.2.2 Symptome.....	3
1.2.3 Auswirkungen auf den Glukosemetabolismus	4
1.2.4 Diagnose	4
1.2.5 Verlauf und Prognose.....	5
1.3 Therapie	5
1.3.1 Chirurgie	5
1.3.2 Medikamentöse Behandlung.....	6
1.3.3 Radiotherapie	9
1.4 Tiermodelle zum Studium der Akromegalie.....	10
1.5 Fragestellung der Doktorarbeit	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Tiermodell.....	13
2.1.1.1 Haltungsbedingungen und Fütterung	13
2.1.2 Lebendgewichtbestimmung	14
2.1.3 Testsubstanzen und Kontrollsubstanz	14
2.1.4 Injektion.....	14
2.1.5 Gewinnung, Aufbewahrung und Aufbereitung des Probenmaterials.....	14
2.2 Studiendesign	16
2.3 Biochemische Methoden.....	20
2.3.1 Glukosebestimmung im Vollblut.....	20

2.3.2	Hormonmessung mittels Immunoassay.....	21
2.3.2.1	Durchführung Immunoassay	23
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.4.1	RNA Isolation	24
2.4.2	cDNA Synthese.....	26
2.4.3	Primer Design.....	27
2.4.4	Gelelektrophorese	28
2.4.5	Real- time PCR.....	30
3	Ergebnisse	34
3.1	Körper- und Organgewichte	34
3.1.1	Short acting Somatostatin Analoga nach einmaliger und mehrmaliger Injektion.....	34
3.1.1.1	Pasireotid.....	34
3.1.1.2	Octreotid	38
3.1.2	Long acting Somatostatin Analoga (LAR) 24 Stunden nach Injektion	42
3.1.2.1	Pasireotid-LAR und Pasireotid-LAR niedrige Dosis.....	42
3.1.2.2	Octreotid-LAR.....	47
3.1.3	Long acting Somatostatin Analoga (LAR) 14 Tage nach Injektion.....	49
3.1.3.1	Pasireotid-LAR	49
3.1.3.2	Octreotid-LAR.....	52
3.2	Glukose	56
3.2.1	Short acting Somatostatin Analoga nach einmaliger und mehrmaliger Injektion...56	
3.2.1.1	Pasireotid.....	56
3.2.1.2	Octreotid	57
3.2.2	Long-acting Somatostatin Analoga (LAR) 24 Stunden nach Injektion.....	57
3.2.2.1	Pasireotid-LAR und Pasireotid-LAR niedrige Dosis.....	57
3.2.2.2	Octreotid-LAR.....	59
3.2.3	Long-acting Somatostatin Analoga (LAR) 14 Tage nach Injektion	59
3.2.3.1	Pasireotid-LAR.....	59
3.2.3.2	Octreotid-LAR.....	60

3.3 IGF- I und Wachstumshormon.....	61
3.3.1 Short acting Somatostatin Analoga nach einmaliger und mehrmaliger Injektion.....	61
3.3.1.1 Pasireotid.....	61
3.3.1.2 Octreotid	64
3.3.2 Long acting Somatostatin Analoga (LAR) 24 Stunden nach Injektion	66
3.3.2.1 Pasireotid-LAR und Pasireotid-LAR niedrige Dosis.....	66
3.3.2.2 Octreotid-LAR.....	71
3.3.3 Long acting Somatostatin Analoga (LAR) 14 Tage nach Injektion.....	74
3.3.3.1 Pasireotid-LAR.....	74
3.3.3.2 Octreotid-LAR.....	77
3.4 Hepatische Expression von IGF- I, Wachstumshormonrezeptor und IGF binding protein3.....	79
3.4.1 Long-acting Somatostatin Analoga (LAR) 24 Stunden nach Injektion.....	79
3.4.1.1 Pasireotid	79
3.4.1.2 Octreotid	81
3.4.2 Long-acting Somatostatin Analoga (LAR) 14 Tage nach Injektion.....	83
3.4.2.1 Pasireotid	83
3.4.2.2 Octreotid	85
4 Diskussion.	88
4.1 Kritische Betrachtung von Material und Methoden	88
4.2 Interpretation und kritische Einordnung der Ergebnisse	89
5 Zusammenfassung.....	107
6 Tabellenverzeichnis.....	110
7 Abbildungsverzeichnis.....	111
8 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme.....	124
9 Danksagung.....	126
10 Veröffentlichungen.....	127
11 Eidesstattliche Versicherung.....	128

1 Einleitung

1.1 Akromegalie

1.1.1 Definition

Akromegalie ist eine endokrinologische Erkrankung, die durch eine Überproduktion und erhöhte Sekretion von Wachstumshormon (englisch: growth hormone, kurz GH) aus der Adenohypophyse (Vorderlappen der Hirnanhangsdrüse) gekennzeichnet ist. Grund dafür ist in den meisten Fällen ein gutartiger Tumor somatotropher Zellen in der Adenohypophyse.

Der französische Neurologe Pierre Marie beschrieb 1886 den für diese Krankheit typischen Symptomkomplex sehr ausführlich und gab ihm den Namen Akromegalie [1]. Der Name beruht auf einer Wortzusammensetzung aus dem Altgriechischen: akros bedeutet „äußerst“ und megas „groß“, bezogen auf die distalen Körperteile, die im Vollbild der Krankheit zu groß, deformiert und im Verhältnis zum restlichen Körper unproportioniert erscheinen.

1.1.2 Epidemiologischer Hintergrund

Bei der Akromegalie handelt es sich um eine seltene Erkrankung, mit einer Inzidenzangabe von 0,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr [2]. Theoretisch kann die Krankheit in jedem Alter auftreten, allerdings befinden sich viele Patienten bei Erstdiagnose zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr [2].

1.2 Klinik

1.2.1 Pathogenese

Um den zu Grunde liegenden Pathomechanismus der Akromegalie zu verstehen, soll zuerst die physiologische Hypothalamus- Hypophysen- Achse, bezogen auf die Stimulation und Hemmung der Wachstumshormonausschüttung, betrachtet werden (Abb.1). Abbildung 1 gibt nur den für diese Arbeit relevanten Weg der Wachstumshormonregulation wieder.

Die Ausschüttung des Wachstumshormons erfolgt pulsatil mit einem Anstieg während des Schlafes und geschlechtsspezifischen Unterschieden, wobei Männer tagsüber niedrigere GH-Konzentrationen aber einen steileren nächtlichen GH- Anstieg aufweisen, während Frauen höhere Basisspiegel mit einer weniger stark ausgeprägten nächtlichen Spitze aufzeigen [3].

Das Wachstumshormon, ein Polypeptid von 191 Aminosäuren, vermittelt seine Wirkung hauptsächlich indirekt über IGF- I (insulin-like growth factor- 1), welches von der Leber synthetisiert und nach Stimulation durch GH ausgeschüttet wird. IGF- I liegt im Blut zum größten Teil gebunden an sein Bindungsprotein und ALS (acid labile subunit) vor. Es existieren sechs hoch-affine der IGFBPs (IGF binding proteins) [4], wovon IGFBP- 3, welches mehr als 75 Prozent des zirkulierenden IGF- I bindet, den größten Teil ausmacht [5].

Bindet IGF- I in der Peripherie an seine Rezeptoren, induziert es unter anderem ein longitudinales Wachstum der Knochen, die Proteinsynthese wird gesteigert, die Glukoseproduktion in der Leber vermindert und die inneren Organe werden zum Wachstum angeregt. IGF- I unabhängige Mechanismen der GH- Wirkung scheinen vor allem während dem Hungerstoffwechsel zum Tragen zu kommen, wobei Lipolyse und Ketogenese das Angebot an Energielieferanten für den Körper aufrecht erhalten [6].

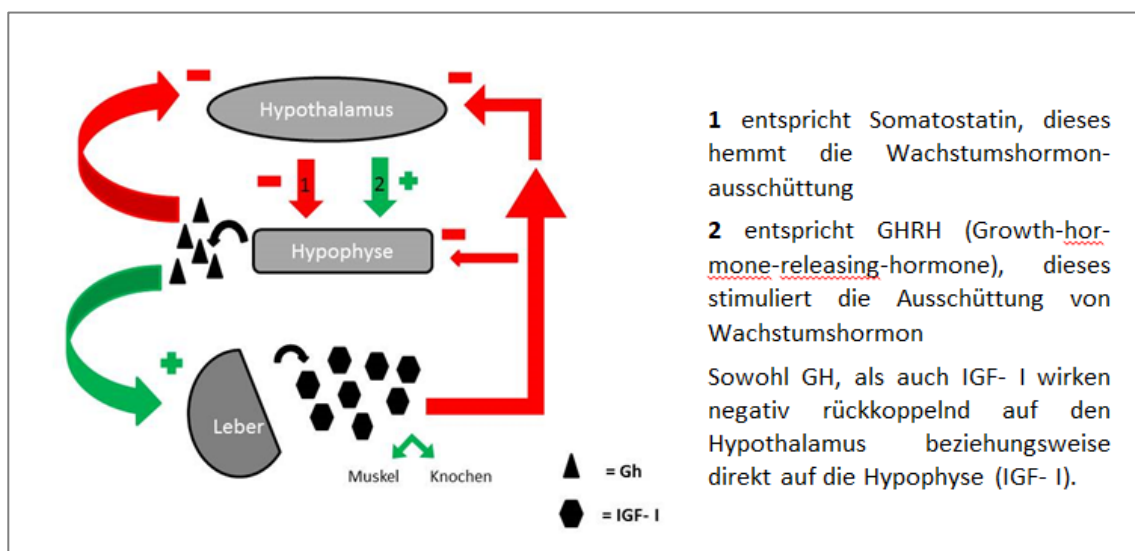


Abbildung 1: Stark vereinfachtes Schema der Hypothalamus- Hypophysen- Achse bezogen auf das Wachstumshormon.

Liegt ein Adenom der Hypophyse vor, gerät die physiologische Achse aus dem Gleichgewicht. Die unphysiologisch gesteigerte Freisetzung von GH stimuliert die IGF- I Freisetzung aus der Leber, welches die bereits genannten Wirkungen vermittelt. Ein Tumor entzieht sich jedoch in den meisten Fällen jeglicher Regulation, sodass die negative Rückkopplung entfällt, beziehungsweise unwirksam wird und folglich unkontrolliert weiter Wachstumshormon und damit IGF- I in den Körper gelangt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch bei Akromegaliepatienten die vorherig erläuterte Ausschüttung in drei Phasen stattfindet, sodass von einer gewissen hypothalamischen Kontrolle ausgegangen werden kann, wobei der Grundspiegel an

Wachstumshormon im Blut bei diesen Patienten auf Grund des Adenoms wesentlich höher liegt [7].

1.2.2 Symptome

Die Symptome lassen sich auf die physiologische Funktion von Wachstumshormon und IGF- I zurückführen und korrelieren mit der Dauer der unkontrollierten Ausschüttung der beiden Hormone. Da sich die Symptome langsam entwickeln, wird die Diagnose oft erst sehr spät gestellt. Meist finden sich dann ausgeprägte morphologische Veränderungen der Patienten, die entweder ihnen selbst, oder nahestehenden Personen auffallen [8].

Im Kindesalter wird das Längenwachstum enorm gesteigert, was sich im Vollbild als Gigantismus präsentiert. Im Erwachsenenalter ist das Längenwachstum beendet, sodass das Wachstum der Akren sowie die viszerale Symptome im Vordergrund stehen. Die Patienten präsentieren sich mit vergrößerten Händen und Füßen, die Gesichtszüge erscheinen gröber und ein Wachstum des Kiefers kann zum Auseinanderweichen der Zähne führen [8].

Die Ablagerung von Mucopolysacchariden führt zu einer verdickten Haut, in schweren Fällen kommt es zu Acanthosis nigricans. Die Talg- und Schweißproduktion ist gesteigert, was der Haut ein ölig-fettiges Aussehen verleiht. 70% der Patienten präsentieren sich mit Arthralgien, da GH und IGF- I die Proliferation des Gelenkknorpels und der periartikulären Bänder fördern. Auch die Wirbelsäule, vor allem der lumbale Anteil, kann betroffen sein und in einer Instabilität mit eingeschränktem Bewegungsumfang münden.

Je nach Größe des Adenoms kann dieses den Sehnerv am Chiasma opticum in seiner Funktion beeinträchtigen und damit zu Gesichtsfelddefekten führen. Die anatomischen Veränderungen des Gesichtsschädels, aber auch des Thorax im Zusammenspiel mit Zunahme der Knorpelmasse und muskulären Veränderungen führen zu respiratorischer Dysfunktion mit Schlafapnoen (50% der Patienten) und Hypoxämie.

Kardiale Manifestationen, welche sich bei 60% der Patienten finden, erhöhen die Mortalität ebenso wie vorherig genannte Veränderungen des respiratorischen Traktes. Hypertonus, Arrhythmien und Hypertrophie mit daraus resultierender diastolischer und im Endstadium systolischer Dysfunktion sind negative Prädiktoren.

Kopfschmerzen, Divertikulose und eine pathologische Glukosetoleranz bis hin zum Diabetes mellitus sind weitere Symptome. Frauen konsultieren nicht selten auf Grund von Infertilität oder ausbleibender Menstruation einen Gynäkologen [8, 9].

1.2.3 Auswirkungen auf den Glukosemetabolismus

Bis zu 50 Prozent der Patienten stellt sich mit unterschiedlichen Schweregraden an Glukoseintoleranz bis hin zum Vollbild des Diabetes mellitus vor [10]. Grund dafür ist eine gesteigerte Insulinresistenz, welche eine verminderte Glukoseaufnahme in insulinabhängige Zellen und folglich eine erhöhte Blutglukosekonzentration bedingt. Das Wachstumshormon scheint für diesen Mechanismus verantwortlich zu sein, da es gleichzeitig die hepatische Glykogenolyse und Glukoneogenese aktiviert, während IGF- I die Glukoseaufnahme in die Zellen stimuliert [11] und somit den Glukosespiegel senkt. Da Diabetes mellitus einen nachgewiesenen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt [12], ist die Kontrolle und gegebenenfalls Behandlung des Blutzuckers ein wesentlicher Bestandteil der Therapie.

1.2.4 Diagnose

Die Entstehung der Symptome verläuft schleichend, sodass sich die Diagnosestellung oft über mehrere Jahre erstreckt ($5,3 \pm 4$ Jahre) [8]. Ein Vergleich mit Fotoaufnahmen aus früheren Jahren ist nicht selten wegweisend für die Diagnose.

Im Labor können die Serumkonzentrationen von Wachstumshormon und IGF- I bestimmt werden. Da das Wachstumshormon einer zirkadianen Rhythmik unterliegt und ein Tagesprofil aus serieller Blutabnahme über 24 Stunden erstellt werden müsste, wird in der Regel IGF- I bestimmt und der Wert mit alters- und geschlechtsspezifischen Referenzwerten verglichen. Zudem scheint IGF- I mit der Krankheitsaktivität, den klinischen Symptomen und erhöhtem GH zu korrelieren [9].

Bei jedem Patienten wird zur weiteren Diagnostik ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt. Im Gesunden nimmt die GH- Konzentration im Serum nach oraler Glukoseaufnahme ab und sollte sehr niedrige Werte erreichen. Häufig werden in Leitlinien Werte kleiner als 1ng/ml zum Ausschluss einer Akromegalie gefordert, wobei der genaue cut- off hier abhängig vom verwendeten GH-Assay ist. [2]. Bei Akromegaliepatienten kommt es aufgrund der weitgehend autonomen Sekretion zu keiner ausreichenden Suppression des GH- Wertes nach Glukoseaufnahme.

Bildgebende Verfahren, wie zum Beispiel die Magnetresonanztomographie (MRT) des Schädels dienen zum Nachweis des Tumors und zur Einschätzung der Größe, der Lokalisation, sowie des Ausmaßes des Wachstums.

1.2.5 Verlauf und Prognose

In einer im Jahr 2007 durchgeführten Metaanalyse wurde eine erhöhte Mortalitätsrate von 1,72 im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung errechnet, die auch nach transssphenoidaler Chirurgie noch bei 1,32 lag [13]. Neuere Studien zeigen hingegen, dass die Normalisierung der GH-, und IGF- I Werte die Mortalitätsrate auf die der allgemeinen Bevölkerung senkt [14, 15].

Die generell erhöhte Mortalität und Morbidität sind vor allem auf Spätkomplikationen der Organomegalie, des Diabetes mellitus mit kardiovaskulären Komplikationen und einer erhöhten Inzidenz anderer Krebserkrankungen zurückzuführen [9]. Auch ein unbegrenztes Wachstum des Adenoms kann zu schwerwiegenden Komplikationen führen, da es auf Grund der intrakraniellen Lokalisation und wucherndem Wachstum benachbarte Strukturen verdrängen und schädigen kann.

Je früher die Krankheit diagnostiziert und eine Therapie eingeleitet wird, desto besser ist die Prognose, da die Dauer der Exposition und damit eine Manifestation morphologischer Veränderungen diese stetig verschlechtert [13].

1.3 Therapie

Die Therapie richtet sich nach der Größe und Lokalisation des Tumors und sollte individuell auf und mit dem Patienten abgestimmt werden. Ziel ist die Normalisierung der Hypophysenfunktion und folglich Senkung der GH- und IGF- I-Konzentrationen. Eine Remission oder Heilung wird an Hand der gemessenen IGF- I-, und, nach durchgeführtem oralem Glukosetoleranztest, GH-Werten beurteilt, welche sich nach erfolgreicher Therapie normalisieren sollten [16]. Prinzipiell existieren drei therapeutische Säulen zur Behandlung der Akromegalie: die operative Entfernung des Tumors, eine medikamentöse Therapie sowie die Radiotherapie. Bei den meisten Patienten wird zunächst eine operative Entfernung des Tumors angestrebt [17, 18] . Ist eine komplette Entfernung nicht möglich, können Therapieformen kombiniert werden, so zum Beispiel eine operative Teilentfernung mit medikamentöser Einstellung zur Kontrolle des restlichen, aktiv sezernierenden Gewebes [18].

1.3.1 Chirurgie

Die chirurgische Intervention verfolgt zwei Ziele: Die teilweise oder idealerweise komplette Entfernung des Tumors unter Erhalt der anatomischen Strukturen und Normalisierung der bio-

chemischen Parameter. Als bevorzugte Operationsverfahren haben sich das minimalinvasive transssphenoidale und endoskopische Verfahren durchgesetzt [19]. Ausschlaggebend für den Erfolg einer Operation sind die Lage des Tumors, die Größe (Mikro-, oder Makroadenom) und die Erfahrung des Chirurgen [20].

In einer Studie mit 214 Patienten konnte gezeigt werden, dass die Heilungsrate von Patienten mit Mikroadenomen und Makroadenomen vergleichbar war (62,8 und 62,2%) [21]. Der Erfolg der Operation hing hierbei wesentlich von der Erfahrung des Chirurgen ab [19, 21], wobei die Heilungsrate ab 108 allgemein durchgeführten Operationen, beziehungsweise 57 Operationen speziell an Akromegaliepatienten, auf 72,6 und 79,4 Prozent von 58,5 und 45,8 Prozent anstieg [21]. Als geheilt galten in dieser Studie Patienten, deren IGF- I Werte auf normale Werte gemäß Alter und Geschlecht sanken, die im oralen Glukosetoleranztest GH- Werte kleiner 0,4µg/L zeigten und bei denen im MRT kein Tumor mehr nachweisbar war [21].

In einer Veröffentlichung der erneuerten Leitlinien der Behandlung der Akromegalie [20] wird die Erfolgsrate bei Mikroadenomen nach Operation mit 75-95%, bei Makroadenomen mit 40-68%, bezogen auf die Normalisierung der IGF- I-Konzentrationen, angegeben. Die Erfahrung eines Chirurgen wird, wie bereits erwähnt, als sehr wichtig eingestuft, wobei 50 Operationen an der Hypophyse pro Jahr als Minimum zur Einschätzung der Expertise angesehen werden.

Ein genereller Vorteil einer Operation ist die schnelle Entlastung umgebender Strukturen durch Entfernung der Tumormasse und die Möglichkeit, eine endgültige histologische Diagnose stellen zu können.

1.3.2 Medikamentöse Behandlung

Auf Grund der guten Ergebnisse unter Behandlung nimmt die pharmakologische Therapie der Akromegalie einen immer größeren Stellenwert ein. Die Pharmaka lassen sich in drei Gruppen einordnen: die Somatostatinanaloga (SSA), den GH- Rezeptor Antagonisten Pegvisomant und die Dopaminagonisten. Anwendung finden vor allem SSA neoadjuvant (vor einer Operation), adjuvant (nach einer Operation), als primäre Therapie bei Makroadenomen und als Überbrückung nach Radiotherapie bis zum Einsetzen des Effektes [22, 23].

A, Somatostatinanaloga

Zu dieser Medikamentengruppe zählen Lanreotid, Octreotid (OCT) und Pasireotid (PAS), die sich vor allem an Hand der Affinität zu unterschiedlichen Somatostatinrezeptoren (Sstr) unterscheiden. Es gibt fünf Subtypen des Rezeptors, welche für den negativen Feedback- Mecha-

nismus des Somatostatins auf die Wachstumshormonausschüttung an der Adenohypophyse und für die verminderte Insulin- beziehungsweise Glukagonausschüttung aus dem Pankreas verantwortlich sind. Sstr 2 und 5 dienen dem physiologischen negativen Rückkopplungsmechanismus, welcher die GH- Ausschüttung vermindert. Beide Sstrs werden von GH- sezernierenden Hypophysenadenomen exprimiert [24, 25], so dass die angewandten Medikamente vor allem eine Affinität für diese Subtypen aufweisen sollten. Dementsprechend binden Octreotid und Lanreotid hoch affin an Sstr 2 [26, 27], während Pasireotid vor allem an Sstr 5 [17, 28], aber auch an die Subtypen 1,2 und 3, bindet.

Somatostatinanaloga werden subkutan oder intramuskulär verabreicht und liegen als kurz- oder langwirksame (long- acting, LAR; slow release, SR) Präparate vor. Da bei den kurzwirksamen Formen eine tägliche Injektion notwendig ist, werden vorzugsweise langwirksame Präparate verschrieben, die alle 11 Tage (Lanreotid SR) oder vier Wochen (Octreotid LAR und Lanreotid Autogel) intramuskulär oder subkutan injiziert werden müssen [26, 29].

1984 kam das kurzwirksame Octreotid (OCT sc) als erstes SSA auf den Markt, bevor in den neunziger Jahren OCT LAR und Lanreotid SR folgten [30]. Heutzutage wird OCT sc kaum noch verwendet, da vor allem die mehrmals tägliche Injektion die Compliance der Patienten verringert und so wirksame Spiegel oft nicht erreicht werden. Ausgewichen wird auf die länger wirksamen Präparate OCT LAR, Lanreotid SR und PAS LAR.

Um die individuelle optimale Dosierung an OCT LAR zu finden, dienen meist 20mg Octreotide LAR als Erstdosis, von der aus, je nach Ansprechen, die Dosis im weiteren Verlauf angepasst werden kann. Unter dieser Therapie normalisiert sich sowohl GH ($<2,5\mu\text{g/L}$) als auch IGF- I in 56% und 66% der Patienten. Die Normalisierung der biochemischen Parameter unter Lanreotid SR wird mit 49% (GH) und 48% (IGF- I) der Patienten angegeben [26]. Lanreotid SR wird als 30mg Depot injiziert [30].

2014 wurde in einer multizentrischen Studie eine orale Form von Octreotid in Phase III an Patienten, welche vorher SSA per injectionem erhalten hatten, getestet. Der Fokus der Studie lag auf der Kontrolle und Beibehaltung der vorher unter SSA eingestellten GH-, und IGF- I Konzentrationen. Mit dieser Zielsetzung wurde das Präparat als wirksame und sichere Variante zur vorherigen Therapie befunden [31].

Des Weiteren wurde 2013 ein Artikel über die Anwendung eines OCT Implantats (84mg) veröffentlicht. Studienteilnehmer waren Patienten, die vorher OCT LAR als Injektion erhalten hatten. 86% der Patienten waren nach der Studienzeit von 24 Wochen durch diese Therapieform erfolgreich eingestellt [32].

Lanreotid ist zudem als Lanreotid Autogel erhältlich, eine Depotform (60, 90 oder 120mg), die alle vier Wochen subkutan verabreicht wird. In einer 48- Wochen Studie erreichten von den in der Studie involvierten Patienten 43% normale IGF- I Spiegel (altersgemäß angepasst), 85% GH- Spiegel $<2,5 \mu\text{g/l}$ und insgesamt 38% lagen bei beiden Parametern im Normalbereich [29]. Die Wirksamkeit dieser Darreichungsform wird der von OCT LAR gleichgesetzt [30].

Ein weiterer wichtiger Effekt der SSA- Therapie ist die Verkleinerung des Tumors, weswegen diese Therapie auch neoadjuvant bei Makroadenomen angewandt wird. Bei 75% der Patienten mit SSA als Primärtherapie konnte 12 Monate nach Behandlungsbeginn ein Rückgang des Tumorgewebes um mehr als 25 % beobachtet werden. Eine Zunahme der Tumormasse war in 2,1% der Patienten zu verzeichnen [33].

Pasireotid, welches in Deutschland erst 2014 die Zulassung zur Behandlung der Akromegalie bekam, zeigt in Studien gegenüber Octreotid eine Überlegenheit im Hinblick auf biochemische Kontrolle der Akromegalie [34-36]. In einer Studie mit 358 zuvor nicht- medikamentös behandelten Akromegaliepatienten wurde über 12 Monate entweder PAS LAR 40mg alle 28 Tage oder 20mg alle 28 Tage appliziert. Nach dem dritten und siebten Monat war eine Erhöhung auf 60mg beziehungsweise 30mg möglich. Eine Suppression auf normale Level (GH $<2,5 \mu\text{g/L}$, IGF- I Alter und Geschlecht angepasst) beider Parameter wurde unter PAS LAR Therapie bei 31,3%, unter OCT LAR bei 19,2% erreicht. Vor allem die Wirkung auf IGF- I war unter PAS LAR ausgeprägter als unter OCT LAR: 38,6 % versus 23,6% der Patienten lagen im Normbereich.

Als relevante Nebenwirkung traten vor allem Hyperglykämien unter PAS LAR häufiger auf [35].

In der PAOLA Studie [34] wurde Pasireotid LAR (40 oder 60mg) direkt mit OCT LAR (30mg) und Lanreotid Autogel (120mg) in Patienten mit schlecht eingestellter Akromegalie verglichen.

Auch hier war PAS LAR den beiden Alternativen überlegen, aber es entwickelte sich häufiger eine transiente hyperglykämische Stoffwechsellagen unter dieser Therapie [27].

B, Pegvisomant

Pegvisomant ist bisher der einzige erhältliche GH- Rezeptor- Antagonist, der vor allem bei Patienten eingesetzt wird, die trotz optimaler und ausgereizter anderweitiger Therapie (Chirurgie, SSA) keine zufriedenstellende Normalisierung der IGF- I Werte erreichen. Somit stellt Pegvisomant in der Regel keinen primären Therapieansatz dar.

Die Wirkungsweise beruht auf der Bindung an und Blockierung des GH- Rezeptors, ohne jedoch eine Konformationsänderung des Rezeptors, welche für die Induktion der Signalkas-

kade nötig wäre, einzuleiten [37]. Durch diesen Mechanismus wird die Freisetzung von IGF- I vornehmlich in der Leber blockiert, welches innerhalb von zwei Wochen auf Werte kleiner 75% des Ausgangswertes fällt [37, 38].

In einer Studie mit Patienten, die unter Höchstdosis an SSA über 24 Monate keine Stabilisierung auf normale Werte zeigten, konnte Pegvisomant nach 12 Monaten in 75% IGF- I auf physiologische Konzentrationen senken und bei 25% den Ausgangswert um 50% reduzieren. Das durchschnittliche Tumervolumen konnte nicht reduziert werden, was angesichts des peripheren Wirkmechanismus auch nicht zu erwarten war [39].

C, Dopaminagonisten

Bromocriptin und Cabergolin sind oral verfügbare, kostengünstige D2- Rezeptor- Agonisten, wobei Cabergolin eine längere Halbwertszeit besitzt [40]. Sie können in einigen Fällen eine signifikante Reduktion der GH-Sekretion bewirken. Verwendet wird vor allem Cabergolin in Fällen, in denen eine alleinige SSA- Therapie nicht ausreicht, wenn Pegvisomant keine Alternative darstellt oder als Monotherapie, wenn andere Therapieoptionen ausscheiden [17].

Cabergolin hat die höchste Ansprechrate, wenn es sich um ein GH- und Prolaktin sezernierendes Adenom handelt und bei IGF- I Ausgangswerten von 750 µg/L oder niedriger [41]. Nebenwirkungen wie Obstipation, Übelkeit und posturale Hypotension können durch ein langsames Einschleichen und einer Einnahme bei gleichzeitiger Nahrungsaufnahme begegnet werden [40]. Trotzdem spielen Dopaminagonisten vor allem aufgrund der gegenüber den anderen medikamentösen Optionen deutlich unterlegenen Wirksamkeit heutzutage in der Therapie eine untergeordnete Rolle.

1.3.3 Radiotherapie

Die Radiotherapie ist Patienten vorbehalten, die einer Operation widersprechen oder eine solche nicht überstehen würden, und jenen, die trotz Operation weiterhin pathologische biochemische Marker zeigen und resistent gegenüber der pharmakologischen Therapie sind [42, 43]. Als Möglichkeiten dieser Therapieform bieten sich die Radiochirurgie mit einer einmaligen, sehr hohen Strahlendosis, oder die stereotaktische, fraktionierte Radiotherapie mit mehreren geringeren Strahlendosen an [43]. Nachteil der Radiotherapie ist die lange Latenzzeit von etwa sechs Jahren zwischen Therapie und Normalisierung von GH und IGF- I im Serum, die Induktion eines Hypopituitarismus und eine eventuelle Schädigung des Chiasma opticums [22, 44].

1.4 Tiermodelle zum Studium der Akromegalie

Einen Großteil der Tiermodelle stellen Maus und Ratte, dar. Zur besseren Untersuchung der Wirkung und Nebenwirkung der Medikamente werden Tiere verwendet, die pathologische GH- und IGF- I- Level aufweisen. Dies kann durch exogene GH- Zufuhr, transgene Manipulation oder Implantation GH- produzierender Zellen erreicht werden.

Zu diesem Zweck werden zum Beispiel MT-hGHRH transgene Mäuse (Metallothionein- human GH- releasing hormone) gezüchtet, die GHRH in großen Mengen synthetisieren, welches wiederum die GH- Ausschüttung stimuliert und folglich hohe IGF- I Werte bedingt [45]. Ein anderes Mausmodell produziert auf Grund eines Transgens, in welchem der Methallothionein Promoter der Maus bovines Wachstumshormon kontrolliert, große Mengen an Wachstumshormon [46].

Auch wenn Mäuse in der Forschung einen hohen Stellenwert einnehmen, sind sie dem Menschen in Physiologie, Anatomie und Lebensspanne sehr unähnlich, sodass langwierige Experimente oder chronische Folgen nur bedingt untersucht werden können [47].

Ein anderes Modell ist die Wistar- Furth Ratte, der subkutan GH- sezernierende Zellen (GC-cells) implantiert werden. 90% der Tiere entwickeln Tumore und die biochemischen und morphologischen Charakteristika der Akromegalie sind nachzuweisen [48]. Ratten sind ein sehr beliebtes Model. Sie sind leicht zu züchten und zu halten, im Gegensatz zu Mäusen Omnivoren und auf Grund ihrer Größe und Anatomie auch für invasivere Studien, Organstudien und serielle Blutabnahmen, wie in dieser Studie, geeignet.

Transgene Kaninchen, die durch Injektion eines chimären PEPCK/bGH Gen (P-enolpyruvate carboxykinase/ bovine growth hormone) in die Zygote generiert werden, zeigen sowohl die anatomischen, histologischen als auch metabolischen Veränderungen und scheinen ein geeignetes Model darzustellen [49].

Als letztes Model sei das Schwein genannt, welches für seine Ähnlichkeit (Physiologie, Anatomie, pathologische Veränderungen) mit dem Menschen bekannt ist [47]. Mittlerweile gibt es transgene Formen [50], die sich auch für längere Studien über Monate und Jahre eignen. Im Vergleich zu den kleineren Nagetieren ist ihre Haltung jedoch aufwendiger und wesentlich teurer.

1.5 Fragestellung der Doktorarbeit

Akromegalie wird meist erst nach vielen Krankheitsjahren diagnostiziert und in vielen Fällen kann eine alleinige Operation zu diesem Zeitpunkt keine Heilung mehr erzielen. Deshalb ist bei diesen Patienten der Einsatz von Medikamenten ein wichtiger Baustein der Therapie um eine optimale Einstellung der beteiligten Hormone zu erreichen.

Da Somatostatinanaloga den größten Anteil der medikamentösen Therapie ausmachen, liegt auf diesem Gebiet ein großes Interesse der laufenden Forschung, um die Therapie und Prognose der Akromegalie stetig zu verbessern und die assoziierte Morbidität und Mortalität zu senken. Jedes Medikament mit nachgewiesener Wirkung trägt jedoch auch das Risiko zur Ausbildung von Nebenwirkungen, welche für den Patienten oft nicht unerheblich ausfallen, so zum Beispiel das Hyperglykämierisiko unter Pasireotid.

Für Pasireotid, welches erst 2014 zur Akromegaliebehandlung zugelassen wurde, ist die Datenlage durchgeführter Studien im Vergleich zu Octreotid oder Lanreotid noch weniger ergiebig. Dementsprechend ist ein Vergleich der Medikamente, ihrer Wirkungsweisen, aber auch ihrer Nebenwirkungsprofile für Ärzte und Patienten von großer Bedeutung.

In mehreren Studien wurde eine Überlegenheit Pasireotids gegenüber Octreotid nachgewiesen (siehe Einleitung). Damit war die Gegenüberstellung der Ergebnisse für beide Präparate bei der Beantwortung der im Folgenden aufgeführten Fragen auch im Rahmen dieser Arbeit das zentrale Ziel. Der Fokus lag hierbei zum einem auf dem Nebenwirkungsprofil, aber auch auf der maximalen Wirkung der Medikamente und einem eventuellen nachzuweisenden, vorhersagbarem Zusammenhang zwischen der prozentualen Suppression von GH und IGF- I. Zudem sollte die bessere Wirksamkeit von Pasireotid in Dosisstudien eruiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Experimente in einem Tiermodell durchgeführt. Die teilweise tägliche Injektion von Medikamenten in verschiedenen Dosen, die serielle Blutentnahme und nicht zuletzt die invasive Probengewinnung nach Tötung (Lebergewebe, perirenale und epididymale Fettpolster) schlossen den Menschen als Studienmodell aus.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Führt die Gabe der Medikamente zu körperlichen Veränderungen der Tiere? Wie ändert sich das Körper- und Lebergewicht, zeigen die physiologisch vorhandenen Fettpolster einen Unterschied zur Vehikelgruppe auf?
- Eine Nebenwirkung von Pasireotid ist die Neigung der Patienten zu einer hyperglykämischen Stoffwechsellaage. Besteht im Nager ein Zusammenhang zu Dosis oder Darreichungsform und wie ändert sich die Blutglukose unter OCT- Therapie?

-
- Ist die maximal erreichbare Suppression von GH und IGF- I durch beide Medikamente vergleichbar? Liegt hier ein Unterschied zwischen den Präparaten (PAS/OCT LAR oder kurzwirksam), der verabreichten Dosis und der Behandlungsdauer vor?
 - Korreliert die prozentuale Suppression von GH mit der prozentualen Suppression von IGF- I? Ist eine 50 prozentige Suppression des GH gleichbedeutend mit einer 50 prozentigen IGF- I Suppression? Ändert sich dieses Verhältnis abhängig von der Versuchsdauer, was ein Hinweis auf eine Wirkabschwächung (Tachyphylaxie) sein könnte?
 - Führt die Therapie mit PAS, PAS LAR, OCT oder OCT LAR zu Veränderungen der hepatischen Genexpression von IGF- I, des GH- Rezeptors und von IGF- I binding protein 3?
 - Ist Pasireotid, abhängig von der Darreichungsform (kurzwirksam versus LAR) und Dosis, Octreotid generell in seiner Wirksamkeit auf die Suppression von GH überlegen oder zeigen sich Limitationen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiermodell

Für die dargestellten Experimente wurden männliche Lewis Ratten verwendet (Charles River; Sulzfeld, Deutschland und Janvier Labs; Saint Berthevin Cedex, Frankreich). Es handelt sich bei den Lewis Ratten um einen Inzuchtstamm, also genetisch identische Tieren. Dies stellte eine wichtige Voraussetzung im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dar, ebenso wie die Voraussetzung, nur ein Geschlecht zu untersuchen, da die Wachstumshormonausschüttung geschlechtsspezifische Unterschiede zeigt [51].

Die Ratten waren bei Lieferung zwischen sechs und acht Wochen alt und circa 150 Gramm schwer. Nach siebentägiger Akklimatisationsphase starteten die Versuche. Aus Kapazitätsgründen wurden die Versuche auf zwei Teilversuche aufgeteilt, wobei die Versuchsbedingungen mit Ausnahme der applizierten Substanzen identisch waren. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden vorab von der Regierung Oberbayern genehmigt (Gz.55.2-1-54-2532.3-90.12).

2.1.1.1 Haltungsbedingungen und Fütterung

Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen in einem separaten Raum der Tierhaltung der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV München in Zweiergruppen gehalten (Makrolonkäfige Eurostandard Typ III, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg). In den Käfigen befand sich Kleintierstreu (Lignocel[®] select- hygienic animal bedding; J. Rettenmaier und Söhne; Rosenberg, Deutschland), sowie jeweils ein roter Plastiktunnel und Holzwolle als Nistmaterial. Alle Ratten hatten ad libitum Zugang zu Wasser per Nippeltränke und wurden mit einem Standardhaltungsfutter ad libitum gefüttert (ssniff chow, ssniff Spezialdiäten GmbH, 59494 Soest, Deutschland). Es herrschten Temperaturen von $22 \pm 1,5$ °C und eine Luftfeuchtigkeit von $60 \pm 15\%$ (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Ein 12 Stunden Hell- und Dunkelrhythmus wurde durch ein künstliches Licht (7- 19 Uhr) vorgegeben.

Bevor die Experimente begannen, wurde eine Eingewöhnungszeit von sieben Tagen eingehalten.

2.1.2 Lebendgewichtbestimmung

Alle Ratten wurden vor Beginn der Experimente, vor jeder Injektion, sowie vor der finalen seriellen Blutentnahme gewogen. Die Waage (Sartorius CP 2201, Sartorius AG, Göttingen Deutschland) war mit einer dynamischen Wiegefunktion ausgestattet, welche den errechneten Mittelwert aus 20 Einzelmessungen innerhalb von zwei Sekunden anzeigte. Dadurch sollten Messabweichungen, ausgelöst zum Beispiel durch Bewegungen der Ratten, minimiert werden. Das Körpergewicht wurde auf eine Nachkommastelle in Gramm erfasst.

2.1.3 Testsubstanzen und Kontrollsubstanz

Alle Testsubstanzen sowie die Kontrollsubstanz (Lösungsmedium, Vehikel) wurden von der Firma Novartis Pharma (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Bei den Testsubstanzen handelte es sich um die Somatostatin-Analoga Pasireotid und Octreotid, sowie um die lang wirksamen Formen Pasireotid- LAR und Octreotid- LAR. Die Testsubstanzen wurden mit dem Lösungsmedium aufgelöst und entsprechend der gewünschten Konzentration verdünnt.

2.1.4 Injektion

Um die Gefahr der Verletzung von Mensch und Tier zu minimieren, wurden die Injektionen zu zweit durchgeführt. Dabei wurde die Ratte von einer Person hinter den Vordergliedmaßen und am proximalen Schwanzansatz festgehalten, sodass Beißen und Kratzen nicht möglich waren. Zur Injektion kamen sterile 2ml Einwegspritzen (Braun) und Nadeln (20G x 1,5- Nummer 1, BD Microlance 3, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) zum Einsatz. Die Lösungen wurden subkutan unter die Haut gespritzt. Bei der Gruppe mit täglicher Injektion über fünf Tage wurden verschiedene Einstichstellen verwendet, um Akkumulation und lokale Reaktionen des Gewebes zu vermeiden.

2.1.5 Gewinnung, Aufbewahrung und Aufbereitung des Probenmaterials

Die Blutentnahme aus einer Schwanzvene der Tiere erfolgte unmittelbar nach der Einzelinjektion, beziehungsweise nach der zehnten Injektion der kurzwirksamen Präparate. Bei den langwirksamen Präparaten wurde ein Intervall von 24 Stunden, beziehungsweise 14 Tagen nach einmaliger subkutaner Injektion eingehalten, bevor Blut entnommen wurde.

Für die seriellen Blutentnahmen wurden 10 Einzelentnahmen (50-80µl pro Entnahme mit heparinisierten Mikro- Hämatokrit- Kapillaren, Brand GmbH, Wertheim) im Abstand von 30 Minu-

ten durchgeführt und das Blut in Röhrchen gesammelt (Reagiergefäß 1,5ml EASY CAP, Sarstedt, Nürmbrecht). Das Blut wurde zehn Minuten bei 12.000UpM (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg), das überstehende Serum abpipettiert und in speziellen Gefäßen (Mikro- Schraubröhre 2ml, PP, Sarstedt, Nürmbrecht) bei -80° Celsius (Heraeus Herafreeze Basic Freezer, Thermo Electron Deutschland GmbH & Co. KG, Karlsruhe) bis zur weiteren Analyse der Konzentrationen von Wachstumshormon eingefroren.

Vor der ersten und nach der zehnten Blutentnahme wurden jeweils circa 20µl Vollblut mit Einmalkapillaren (Glucocapil Entnahmesystem 2,0 ml, Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital) zur Glukosebestimmung abgenommen. Um eine korrekte Bestimmung des Blutzuckers zu gewährleisten, wurde das Vollblut in speziellen Reaktionsgefäßen, welche Teil des Glucopil- Entnahmesystems (Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital) waren, gesammelt, zur Vermischung der Reagenzien gründlich geschüttelt und eingefroren. Über die sogenannte Glucose-Oxidase Methode wurde die Glukosebestimmung im weiteren Verlauf durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1).

Nach der Blutentnahme wurden alle Ratten in einem separaten Raum getötet. Dazu wurden sie in einem Glasbehälter mit verdampften Isofluran (Forene®, Abbott GmbH und Co. KG, Wiesbaden) tief narkotisiert, um nach Verlust des Bewusstseins mit Hilfe einer Guillotine dekapitiert zu werden. Das aus den Jugularvenen und Karotiden austretende Blut wurde mit einem Trichter in Serumröhrchen (S-Monovette Serum Gel, Sarstedt AG und Co; Nümbrecht) aufgefangen und geschwenkt (siehe Herstellerangaben), um das Vollblut mit dem Gerinnungsaktivator zu vermischen. Danach wurden die Monovetten zentrifugiert (Rotanta 46 RC, 3000 RPM, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen), das Serum abpipettiert und in speziellen Röhrchen (CryoTube, Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold) bei -80 °Celsius eingefroren.

Bei der darauffolgenden Sektion mit Einmalskalpellen und Standardsektionsbesteck wurden die Leber, sowie epididymales - den Hoden umgebendes- und perirenales Fett einseitig exziiert, von umgebendem Gewebe befreit und in Milligramm gewogen (Genauigkeit bis auf 0,001g; Scaltec Instruments, Göttingen). Zudem wurden für zukünftige Studien Gewebeproben aus dem Musculus quadriceps und die Hypophyse entnommen.

Die auf dem Rücken liegenden Körper wurden bauchseitig entlang der Medianen eröffnet. Die Leber wurde mobilisiert, von den umgebenden und aufhängenden Strukturen gelöst, im Ganzen herausgenommen und gewogen. Der Magendarmtrakt wurde nach rechts verlagert, um linker Hand den Retroperitonealraum mit der linken Niere einsehen und das perirenale Fettgewebe ablösen zu können. Das Fettgewebe wurde von Niere und Nebenniere abpräpariert und gewogen.

Um an das epididymale Fett zu gelangen, wurde das Skrotum von inguinal eröffnet. Das Fettdepot wurde einseitig von Testis (Hoden), Epididymidis (Nebenhoden) und Ductus deferens (Samenleiter) gelöst, entnommen und gewogen.

Kleine Proben (circa 1cm²) der Gewebe wurden auf Trockeneis schockgefroren, um das Gewebe für die RNA- Extraktion und weitere Genanalysen zu konservieren. Die Gewebestücken wurden bis auf weiteres bei -80° Celsius eingefroren.

Die toten Ratten wurden gemäß dem Tierkörperbeseitigungsgesetzes (BGBI 2001) entsorgt.

2.2 Studiendesign

Insgesamt wurden 186 Ratten zufällig auf neun Gruppen verteilt (Abbildung 2). Innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen gab es Untergruppen, welche die verschiedenen Dosierungen oder die Vehikelsubstanz erhielten. Diese Untergruppen bestanden aus jeweils sechs männlichen Lewis Ratten (n=6).

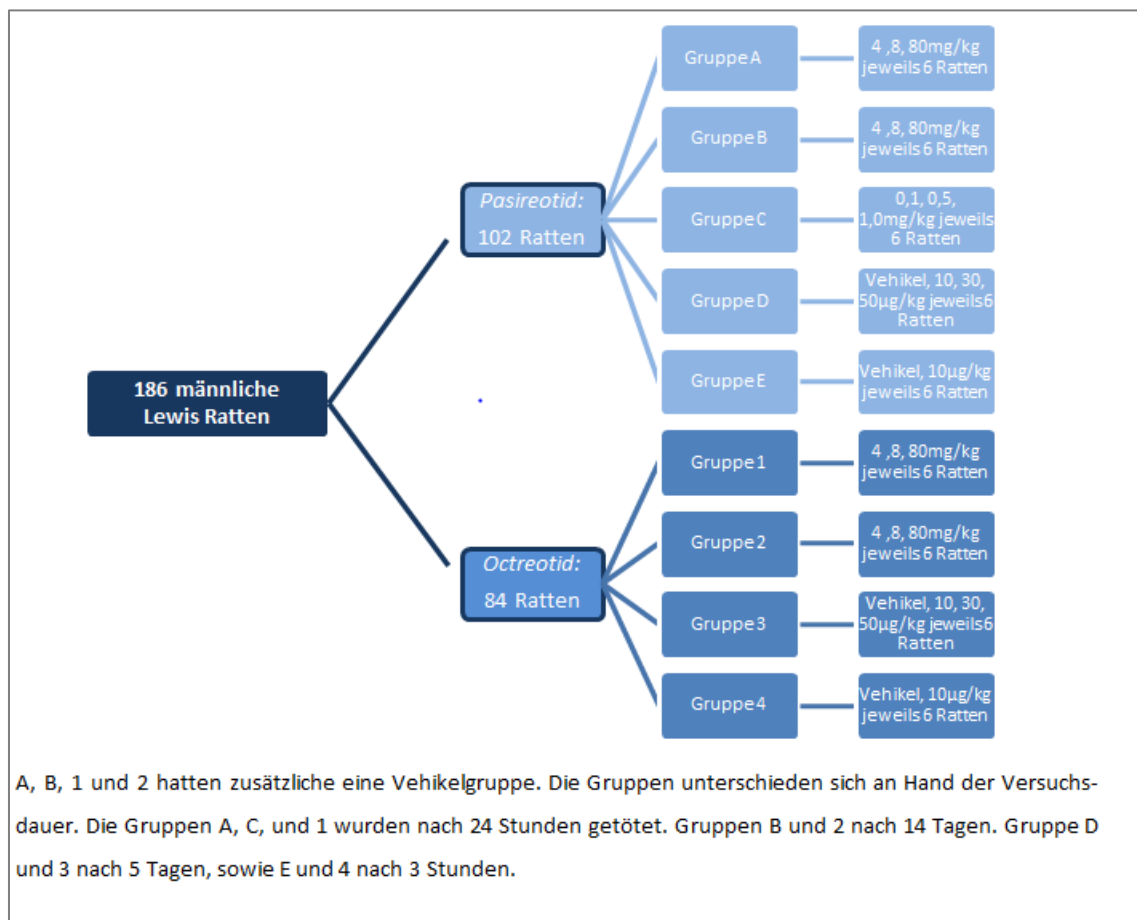


Abbildung 2: Aufteilung der Ratten in die unterschiedlichen Behandlungsgruppen.

Zur besseren Übersicht wurden die Gruppen, welche Teil des Pasireotid -Experimentes waren, mit Buchstaben gekennzeichnet, während die des Octreotid -Experiments Nummern erhielten. Die beiden Teilerperimente waren, bis auf Gruppe C (siehe Tab. 1) des Pasireotid- Experiments, analog aufgebaut, mit derselben Gruppengröße, den gleichen Dosierungen und exakt gleicher Dauer der einzelnen Experimente.

Pasireotid:

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E
Medikament	PAS-LAR	PAS-LAR	PAS-LAR	PAS	PAS
Dauer der Behandlung	24h	14 d	24h	5d	3h
Anzahl an Ratten (=n)	24	24	18	24	12

Angegeben ist die Dauer der Behandlung in Stunden (h) und Tagen (d), sowie die Anzahl (=n) aller Ratten einer Gruppe ohne Differenzierung der Untergruppen an Hand unterschiedlicher Dosierungen.

Tabelle 1: Liste der verschiedenen Pasireotidgruppen mit langwirksamen Präparaten (LAR) und kurzwirksamer Variante.

Octreotid:

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Medikament	OCT-LAR	OCT-LAR	OCT	OCT
Dauer der Behandlung	24h	14d	5d	3h
Anzahl an Ratten (=n)	24	24	24	12

Angegeben ist die Dauer der Behandlung in Stunden (h) und Tagen (d), sowie die Anzahl (=n) aller Ratten einer Gruppe ohne Differenzierung der Untergruppen an Hand unterschiedlicher Dosierungen

Tabelle 2: Liste der verschiedenen Octreotidgruppen mit langwirksamen Präparaten (LAR) und kurzwirksamer Variante.

A, Telexperiment mit Pasireotid

In den *Gruppen A und B* (siehe Tabelle 1) fanden sich jeweils 24 Ratten in vier Untergruppen à sechs Tieren. Diese vier Untergruppen erhielten eine Injektion von PAS- LAR in folgenden Dosierungen:

Pasireotid- LAR

1. Gruppe	4mg/kg
2. Gruppe	8mg/kg
3. Gruppe	80mg/kg
4. Gruppe	Vehikel

*Überblick der einzelnen Gruppen;
Dosierungen gelten für PAS- LAR
Medikament*

Tabelle 3: PAS- LAR Dosisgruppen.

Die Tiere der Gruppe A wurden nach 24 Stunden, die der Gruppe B nach 14 Tagen getötet.

Tiere der *Gruppe C* mit 18 Ratten in drei Untergruppen erhielten PAS- LAR in folgenden Dosierungen:

1. Gruppe	0,1mg/kg
2. Gruppe	0,5mg/kg
3. Gruppe	1,0mg/kg

*Überblick der einzelnen
Gruppen; Dosierungen gelten
für PAS- LAR Medikament*

Tabelle 4: PAS- LAR niedrige Dosisgruppen.

Als Bezugsgruppe wurde die Vehikelgruppe der Gruppe A und die Vehikelgruppe der OCT LAR über 24 Stunden behandelten Tieren hinzugezogen. Die Tiere wurden nach 24 Stunden getötet.

Pasireotid kurzwirksam

Gruppe D, bestehend aus 24 Tieren in 4 Untergruppen, wurde aufgeteilt in folgende Dosisgruppen:

1. Gruppe	10µg/kg
2. Gruppe	30µg/kg
3. Gruppe	50µg/kg
4. Gruppe	Vehikel

Überblick der einzelnen Gruppen; Dosierungen gelten für kurzwirksames Pasireotid

Tabelle 5: PAS kurzwirksam Dosisgruppen.

Die Tiere wurden über fünf Tage zweimal täglich mit Pasireotid behandelt und nach dem fünften Tag getötet.

Gruppe E bestand aus nur 12 Tieren, wovon sechs Tiere Vehikel und sechs Tiere 10µg/kg Pasireotid injiziert bekamen. Die Tiere wurden nach drei Stunden getötet.

B, Teilexperiment mit Octreotid

Octreotid- LAR

In den Gruppen 1 und 2 (siehe Tabelle 2) fanden sich jeweils 24 Ratten in vier Untergruppen à sechs Tieren. Diese vier Untergruppen erhielten eine Injektion von OCT- LAR in folgenden Dosierungen:

1. Gruppe	4mg/kg
2. Gruppe	8mg/kg
3. Gruppe	80mg/kg
4. Gruppe	Vehikel

Überblick der einzelnen Gruppen; Dosierungen gelten für OCT- LAR

Tabelle 6: OCT- LAR Dosisgruppen.

Die Tiere der Gruppe 1 wurden nach 24 Stunden, die der Gruppe 2 nach 14 Tagen getötet.

Octreotid kurzwirksam

Gruppe 3, bestehend aus 24 Tieren in 4 Untergruppen, wurde aufgeteilt in folgende Dosisgruppen:

1. Gruppe	10µg/kg
2. Gruppe	30µg/kg
3. Gruppe	50µg/kg
4. Gruppe	Vehikel

Überblick der einzelnen Gruppen; Dosierungen gelten für kurzwirksames Octreotid

Tabelle 7: OCT kurzwirksam Dosisgruppen.

Die Tiere wurden über fünf Tage zweimal täglich mit Octreotid behandelt und nach der zehnten Injektion getötet. Da vor Dekapitation die serielle Blutentnahme durchgeführt wurde, erfolgte die erste Injektion abends. So wurde gewährleistet, dass nach der zehnten Injektion die Blutentnahme durchgeführt, und die Tiere danach getötet werden konnten.

Gruppe 4 bestand aus nur 12 Tieren, wovon sechs Tiere Vehikel und sechs Tiere 10µg/kg Octreotid injiziert bekamen. Die Tiere wurden drei Stunden nach Injektion getötet.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Glukosebestimmung im Vollblut

Zur Messung der Glukose im Vollblut wurden die Proben aufgetaut und kräftig geschüttelt. Das verwendete Gerät, der Glukoseanalyzer EcoSolo® von Care Diagnostica (Vorde, Deutschland) misst die Glukosekonzentration im Vollblut dabei auf Basis der Glukose-Oxidase Methode. Nach Kalibration des Gerätes mit einer Lösung des Geräteherstellers (Care Diagnostica) wurden die Proben erneut geschwenkt, der Deckel geöffnet und abgeschnitten, die Gefäße einzeln in die Messvorrichtung gesteckt und der Messvorgang gestartet. Die Glukosekonzentration wurde für jede Probe einzeln gemessen.

Bei der Glukose-Oxidase Methode wird Glukose durch das Enzym Glukoseoxidase oxidiert, wobei Wasserstoff entsteht. Dieser Wasserstoff wird auf molekularen Sauerstoff übertragen und es entsteht Wasserstoffperoxid, welches in einer nachgeschalteten Farbreaktion mit Hilfe einer Peroxidase wiederum zu Sauerstoff reduziert wird. Der Farbumschlag kann photometrisch bestimmt werden [52].

2.3.2 Hormonmessung mittels Immunoassay

A, Hintergrund

Ein Immunoassay ist ein biochemisches Verfahren, welches die spezifische Bindung von Antikörpern an Antigene als Nachweismethode gesuchter Antikörper, Hormone, Proteine oder Peptide nutzt. Dieses, seit den 1970er-Jahren auch kommerziell verfügbare Verfahren beruht somit auf dem von der Natur abgesehenen Prinzip der sogenannten erworbenen Immunabwehr, welches von gesunden Säugetieren zur Bekämpfung von Krankheiten effizient eingesetzt wird. Im Folgenden wird vor allem auf die sogenannte ELISA- Methode (enzyme-linked immunosorbent assay) eingegangen, da vor allem dieser Immunoassaytyp für die vorliegende Arbeit genutzt wurde.

Entwickelt wurde die ELISA-Methode von Peter Perlmann und Eva Engvall in Schweden, die erste Veröffentlichung mit den Ergebnissen erschien 1971 [53] . Gleichzeitig arbeiteten in den Niederlanden Bauke van Weemend und Anton Schuurs an einem ähnlichen Verfahren, Enzyme Immunoassay, kurz EIA, genannt. Zuletzt Genannte veröffentlichten im selben Jahr ihre eigenen Ergebnisse [54]. Gemeinsam ist beiden Gruppen, dass die Grundlage für dieses Verfahren der schon länger etablierte RIA, Radioimmunoassay, war, welcher auf Grund der benötigten Radioaktivität zu Sicherheitsdebatten geführt hatte.

B, Antikörper

Antikörper binden über ihre Antigen-Bindungsregion spezifisch an auf Antigenen lokalisierten Epitope. Unterscheidbar sind hierbei monoklonale von polyklonalen Antikörpern.

Monoklonale Antikörper sind hoch spezifisch. Es handelt sich um stets exakt identisch reproduzierbare Antikörper, die jeweils ein und demselben Klon immortalisierter Immunzellen entstammen. Die hohe Spezifität kommt dadurch zustande, dass monoklonale Antikörper ein definiertes Epitop binden. Polyklonale Antikörper hingegen sind eine Mischung von im immunisierten Tier entstandenen Antikörpern. Da es sich nicht um Klone eines Antikörpers handelt, sondern um verschiedene Antikörper, können diese unterschiedliche Epitope binden.

In dem von uns genutztem Wachstumshormon (Growth Hormone, GH) ELISA von Millipore kamen nur polyklonale Antikörper zum Einsatz. Zum Nachweis von IGF- I wurde sowohl eine mit monoklonalen Antikörpern, als auch eine mit polyklonale Antikörper beschichtete Platte verwendet.

C, ELISA

Es gibt verschiedene Arten von Immunoassays, die sich vor allem in der von ihr getragenen Markierung und der Art des gemessenen Signals unterscheiden, aber alle auf demselben Grundprinzip beruhen. Ein in einer Probe gesuchtes Antigen bindet spezifisch an einen Antikörper, welcher im Zuge der Durchführung des ELISA zur Probe gegeben wird. Dieser Antikörper ist entweder selbst mit einem Enzym markiert oder wird von einem zweiten Antikörper gebunden, welcher dann die bestimmte Markierung trägt. Natürlich ist dies auch im gegenläufigen Fall möglich, sodass der Antikörper gesucht wird und die hinzugefügten Antigene enzymmarkiert sind. Auf Grund enzymatischer Umsetzung eines Substrates kommt es in der Probe zu einem Farbumschlag, dessen Intensität sowohl quantitativ-, als auch qualitativ gemessen und beurteilt werden kann. Je nach verwendetem Substrat geschieht dies spectrophotometrisch oder über Fluoreszenz.

Quantitativ muss nun die Konzentration des gesuchten Analyten, welcher in der Probe enthalten war und gebunden werden konnte, bestimmt werden. Hierbei wird eine Konzentration gemessen, die im Verhältnis zu einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen des Analyten berechnet wird.

D, Unterschiede der Immunoassays

Beim sogenannten Sandwich ELISA wird der gesuchte Analyt zwischen zwei Antikörpern gebunden, demjenigen, der die Plattenoberfläche auskleidet und einem zweiten, welcher spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. Nach einem Waschvorgang wird ein dritter, enzymmarkierter Antikörper hinzugefügt, der über die Umsetzung eines Substrates für die Farbänderung sorgt.

Im Fall des kompetitiven Immunoassay konkurriert der gesuchte Analyt, das Antigen, mit einem zweiten identischen Antigen auf der Mikrotiterplatte um die Bindungsstellen des Antikörpers. Je mehr von dem gesuchten Antigen in der Probe enthalten ist, desto weniger Antikörperbindungsstellen werden frei sein, um von dem synthetischen Antigen gebunden zu werden.

Nach Abwaschen aller freien Antikörper wird mit einem sekundären Antikörper mittels Substratumsetzung die vorhandene Menge an Antigen in der Probe bestimmt. In diesem Fall ist das abgegebene und zu messende Signal umso niedriger, je mehr Antigen in der Probe enthalten war. Es wird folglich die Abnahme des Signals gemessen und die Kurve wird mit höherem Gehalt an gesuchtem Analyt abfallen.

E, Standardkurve

Die Standardkurve, eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen, wird für jede Testplatte neu angelegt. Dies ist nicht nur für die quantitative Beurteilung relevant, sondern gibt auch Auskunft über die Qualität des durchgeführten Immunoassay. Durch dieses Vorgehen wird sichergestellt, dass die Konzentrationen in den Proben auf jeder Platte an Hand der eigens angelegten Standardkurve beurteilt werden. Ein Vergleich mehrerer Platten untereinander ist zwar in gewissem Rahmen möglich, aber zufällige Schwankungen der Inkubationsbedingungen oder Fehler des Operators würden sich ohne Anlegen einer eigenen Standardkurve pro Platte stark auf die Vergleichbarkeit auswirken.

Die Kurve wird in einem Diagramm mit der Konzentration im Logarithmus auf der X- Achse im Verhältnis zur gemessenen optischen Dichte als Y-Achse aufgetragen. Je nach verwendetem Assay (hier Sandwich-ELISA oder kompetitiver EIA) fällt die Kurve ab oder steigt an.

2.3.2.1 Durchführung Immunoassay

Die Messungen wurden mit Assay-Kits und gemäß Herstelleranleitung durchgeführt, wobei jeder Wert als Duplikat gemessen wurde. Die Proben wurden vollständig aufgetaut und zusammen mit den in den Kits enthaltenen Kontrollsubstanzen und Standardkonzentrationen regelrecht verdünnt und auf die Platten aufgetragen.

Auf Grund teilweiser sehr geringer Serummengen war es in einigen Fällen nur möglich, einen Einzelwert zu bestimmen. In anderen Fällen musste auf eine eins zu fünf Verdünnung ausgewichen werden, welche aus zwei μl Serum und acht μl Assay Puffer bestand.

Wie zuvor erläutert, wurden alle Proben und Kontrollen doppelt pipettiert, um einen Mittelwert zu erhalten. In Einzelfällen überschritt die Abweichung zwischen den beiden Einzelwerten die 20 Prozent, sodass, wenn möglich, die Messung wiederholt wurde. War dies nicht möglich konnte in einigen Fällen einer der zwei Einzelwerte gestrichen werden, da er offensichtlich unplausibel war. Als Grundlage der Beurteilung dienten hierbei die weiteren, im selben Assay gemessenen Werte derselben Ratte, zu denen die fraglichen Ergebnisse in Bezug gesetzt wurden.

Die Messung der Absorption im Bereich bestimmter Wellenlängen und die Umrechnung der gemessenen Werte in Konzentrationen im Bezug zur Standardkurve erfolgte mit einem Photometer (Victor 3, 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer, USA) und einer speziellen Software (11224 Multicalc, Version 2.7, Perkin Elmer, USA). Die Ergebnisse wurden für die spätere Interpretation und den Vergleich in einer Tabelle (Microsoft Excell 2007) festgehalten.

Wachstumshormon

Zur Messung der Wachstumshormonkonzentration im Serum der Ratten wurde ein ratten-beziehungsweise mausspezifischer Sandwich ELISA der Firma Millipore (LOT Nummer 236 2194; polyklonale Antikörper) verwendet.

Die Sensitivität des Assay wird von Millipore bis 0,07 ng/ml in einer 10µL Probe angegeben, die Spezifität für Wachstumshormon mit 100% (siehe Produktdatenblatt des Herstellers).

Es werden zwei mitgelieferte Kontrolllösungen und die Standardreihe mit ansteigenden Konzentrationen auf die Platte pipettiert, bevor die verdünnten Serumproben jeweils zweifach in die Plattenvertiefungen übertragen werden. Im Serum enthaltenes Wachstumshormon bindet an den auf der Platte befindlichen Antikörper, um in einem späteren Schritt von einem sekundären Antikörper fixiert zu werden. Nach Hinzufügen einer Substratlösung ist ein enzymatischer Farbumschlag zu sehen, der umso intensiver verläuft, je mehr Wachstumshormon in der Serumprobe enthalten war. Es wird eine Stopplösung hinzugefügt und die Absorption bei Wellenlängen von 450 und 590nm gemessen.

IGF- I

Für die quantitative Bestimmung der IGF- I Konzentration wurde ein rattenspezifischer IGF- I Immunoassay der Firma IDS (Immunodiagnostic systems Ltd.) verwendet (Lot Nummer 23136, Haltbarkeitsdatum April 2015). Es handelt sich hierbei um einen immuno-enzymetrischen Assay (IEMA). Die Sensitivität wird von IDS mit 63ng/ml angegeben.

Auf die mit monoklonalen Ratten IGF- I Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte werden wiederum die Kontrollen, Standardkonzentrationen und Serumproben in Duplikaten pipettiert. Ein mit Biotin gekoppelter zweiter polyklonaler Antikörper bindet an im Serum enthaltenes IGF- I. Der Biotinkomplex bindet eine in einem späteren Schritt hinzugefügte Meerrettich Peroxidase, welche im Zusammenspiel mit chromogenem Tetramethylbenzidin für den Farbumschlag sorgt. Bevor die Absorption bei 450nm gemessen werden kann, wird die Reaktion mit Salzsäure gestoppt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA Isolation

RNA (Ribonukleinsäure) ist im Vergleich zur DNA sehr fragil. Während DNA als Doppelstrang vorliegt, besteht RNA aus einem Strang und ist sehr anfällig für den Abbau von ubiquitär vor-

kommenden RNAsen. Deshalb müssen beim Umgang mit RNA einige Besonderheiten bedacht werden. Gewebeproben werden bei -80 ° Celsius gelagert und nur auf Trockeneis transportiert. Um das Gewebe gegen RNAsen zu schützen, werden Handschuhe getragen und alle Materialien (Pipettenspitzen, Röhrchen etc.) müssen RNase frei sein. Um RNA isolieren zu können, muss das Gewebe erst homogenisiert und die Zellen aufgebrochen werden (siehe Arbeitsschritte).

In dieser Studie wurde zur RNA Isolation das simply Maxwell 16 LEV RNA Tissue Kit (Promega) benutzt. Alle verwendeten Materialien stammen aus diesem Kit.

Arbeitsschritte

Während der Sektion der Ratten wurden Gewebestücke auf Trockeneis schockgefroren, um dann bei -80° Celsius (Heraeus, Thermo Electron) in Gewebepplatten (Tissue Culture plate 24-Well, Sarstedt) bis zum nächsten Arbeitsschritt gelagert zu werden.

Die Platten wurden nach Herausnahme aus dem Gefrierschrank auf Trockeneis gelagert und die Zeit außerhalb des Gefrierschranks wurde auf maximal 1 Minute limitiert, um die Gefahr des Auftauens und der damit einhergehenden Denaturierung zu minimieren.

Mit einem Rasiermesser wurden Organproben von circa 20- 50 Gram vom gefrorenen Gewebe abgetrennt und in autoklavierte und RNase-freie Röhrchen (Eppendorf), gefüllt mit Homogenisat Puffer (200µl Homogenisat und 4µl Thioglycerat), übertragen. Auch diese Gefäße befanden sich auf Eis, um die Kühlkette nicht zu unterbrechen. Rasiermesser und Pinzette wurden mit RNase away (Molecular BioProducts, Fisher Scientific) gereinigt.

Zur Zerkleinerung und zum Aufbrechen der Zellen wurde eine Stahlkugel (Stainless steel beads, 5mm; Qiagen) in das Gefäß hinzugegeben und das verschlossene Gefäß auf einem Lyser (TissueLyser LT Qiagen) für 1,30min bei 50 Umdrehungen pro Sekunde belassen. Daraufhin wurde 200µl Lysis Lösung hinzugefügt und die Mischung für 5 Sekunden gevortext (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Während die Maschine (Maxwell 16 Instrument, Promega) und die Kartusche zur eigentlichen RNA Isolierung vorbereitet wurden, wurden die Eppendorfgefäße auf Eis gesetzt.

Die Kartusche wurde gemäß Herstelleranleitung mit Pipettenspitzen und mitgelieferten kleineren Tuben, in welche 50µl RNase freies Wasser pipettiert wurde, bestückt. Außerdem wurde in eine Vertiefung der Kartusche 5µl DNase hinzugegeben, um Reste von DNA abzubauen und als Ergebnis reine RNA zu erhalten.

Als Ausgangsmaterial wurden jeweils 400µl der gewebehaltigen Lösung in ein Eppendorfgefäß pipettiert und dieses auf der Kartusche platziert. Das Programm simply RNA wurde gestartet. Die Konzentration der isolierten RNA wurde spectrophotometrisch gemessen und die RNA bei -80° Celsius eingefroren.

Messung der RNA- Konzentration

Der Messarm des Spectrophotometers (Nanodrop 1000) wurde mit nukleasefreiem Wasser und einem Einwegtuch gereinigt, bevor mit 1,5µl nukleasefreiem Wasser geeicht wurde. Mit Hilfe der Software Nanodrop 1000 V3.6.0 (Thermo Scientific) wurden die RNA- Proben ausgewertet und das Ergebnis in ng/µl angegeben. Dafür wurden jeweils 1,5µl der isolierten RNA aufgetragen, die Messung gestartet und die Messfläche daraufhin wieder gereinigt, um ein Vermischen der unterschiedlichen RNAs zu verhindern. Bei Resultaten unter 50ng/µl wurde die RNA Extraktion wiederholt.

2.4.2 cDNA Synthese

Die cDNA- Synthese (complementary DNA) wurde in Gruppen durchgeführt, wobei alle vorangegangenen RNA- Extraktionen innerhalb einer Gruppe am selben Tag durchgeführt worden waren. Die benötigte Menge an RNA betrug 9µl, wobei alle Proben der Gruppe jener mit der geringsten RNA- Konzentration (Ergebnisse der Nano Drop Messung) angepasst und dementsprechend mit RNase freiem Wasser verdünnt wurden. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und mit autoklavierten Pipettenspitzen und in autoklavierten Gefäßen (beides Eppendorf), um die Integrität der RNA zu bewahren. Die Umschreibung zur cDNA wurde mit Super Script III First-Strand synthesis Supermix for qRT-PCR (Invitrogen) durchgeführt und alle Reagenzien stammten aus diesem Kit.

Die RNA wurde aufgetaut und währenddessen der Mastermix vorbereitet. Für 51 Reaktionen wurden 561µml des Mixes benötigt. Hierfür wurden 510µl des 2x RT Mix und 51µl des RT Enzyme in ein 1ml autoklaviertes Eppendorfgefäß pipettiert und geschwenkt.

In jede zweite Reihe (siehe Abb.3) der Platte (96 PCR- Platte; Sarstedt) wurden zuerst 11µl des Mastermixes in die Reaktionsvertiefungen der Platte pipettiert. Hinzugefügt wurde die zuvor berechnete Menge an RNA und gegebenenfalls die benötigte Menge an autoklaviertem Wasser (Nuclease-Free water; Promega). Die Platten wurden mit Folie bedeckt und in der Maschine (T100 Thermal Cycler; Biorad) platziert. Das Programm wurde gestartet.

Zyklus 1	25 ° C	10 min
Zyklus 2	50 ° C	30 min
Zyklus 3	85 ° C	5 min
Zyklus 4	37 ° C	20 min

Überblick der einzelnen Zyklen der cDNA Synthese mit Temperaturangabe in Celsius und Dauer in Minuten.

Tabelle 8: Zyklusschritte.

Zwischen Zyklus drei und vier wurde pro Vertiefung 1µl E. coli RNase H hinzugefügt. Diese wurde benötigt, um nicht umgeschriebene RNA abzubauen und als Ergebnis reine cDNA zu garantieren. Die Platten wurden bei - 20 ° Celsius eingefroren.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Schematische Darstellung der 96-Well Platte zur cDNA Synthese.

Die grau hinterlegten Reihen blieben für die späteren Verdünnungen leer.

Abbildung 3: 96 well Platte.

2.4.3 Primer Design

Alle in dieser Arbeit genutzten Primer wurden eigens für diese Studie hergestellt. Die Primer wurden bei Metabion (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) trocken bestellt und mit nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100µM/Milliliter verdünnt und aufbewahrt. Die für die PCR schlussendlich verwendete Konzentration betrug 300nM.

Im ersten Schritt wurde beim NCBI (National Center for Biotechnology Information [55]) das gewünschte Gen in Referenz zur gewünschten Spezies, in dieser Studie Rattus norvegicus, aufgerufen und die mRNA Sequenz geöffnet. Mit Hilfe der mRNA Reference Sequence wurde im BLAST® Programm (Basic Local Alignment Search Tool [56]) die komplette mRNA Sequenz

gesucht, um diese dann bei Primer 3 [57] einzufügen. Um geeignete Primer zu finden, wurde die Produktgröße auf 80 bis 180 Basenpaare beschränkt. Die gefundenen Primer wurden dahingehend überprüft, dass sie auf zwei verschiedenen Exons, getrennt durch mindestens ein Intron, lagen und eine Größe von 180 Basenpaaren nicht überschritten.

Nach diesem Schritt wurden die Primer Sequenzen in das „mfold“ (DNA-folding-Form [58]) kopiert. Nach Änderung der Natrium Konzentration auf 10mM und der Magnesium Konzentration auf 2,5mM wurde die Faltstruktur aufgerufen (siehe Abb. 3). Dabei war es wichtig darauf zu achten, dass die initiale freie Energie (dG) zwischen 0 und 5 lag und am 5' sowie 3' Ende so wenige Ausläufer wie möglich vorlagen. Generell sollte das Produkt wenige ausladende Faltstrukturen zeigen, um ein späteres Anlagern des Primers zu vereinfachen (siehe Abbildung 4).

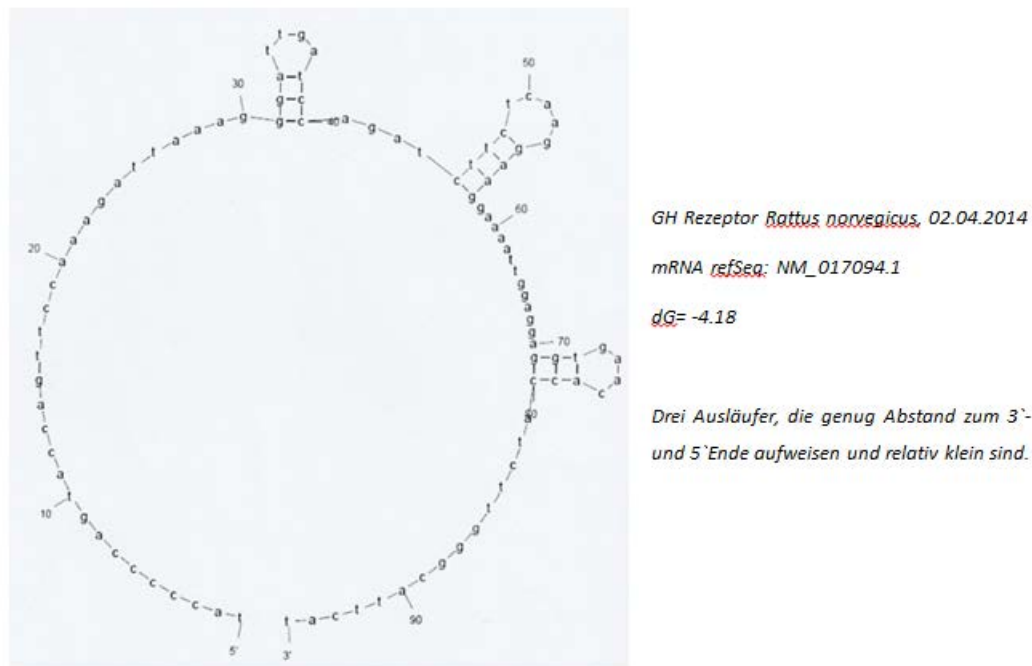


Abbildung 4: Struktur eines Primers.

2.4.4 Gelelektrophorese

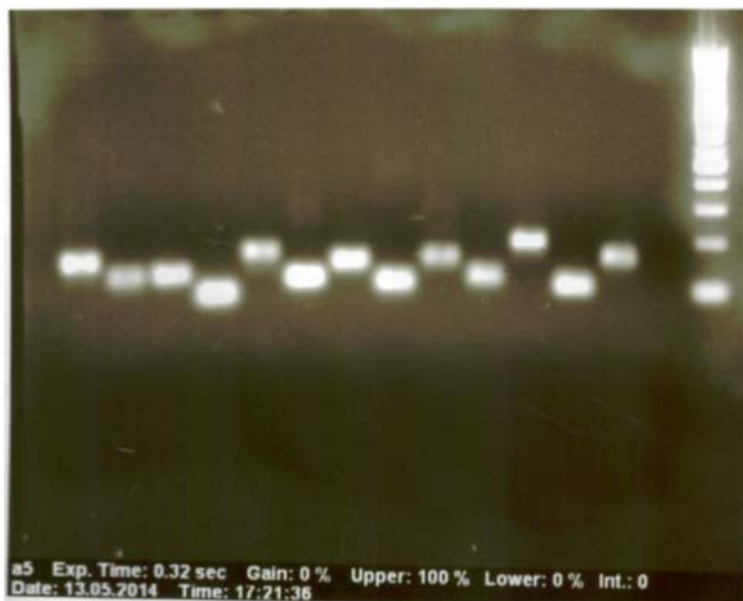
Als Grundlage wurde ein 1%-tiges Gel hergestellt, wofür 100ml TBE- Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) und 1g Agarose Pulver (PeqLab Biotechnologie) in ein 500ml Gefäß gegeben, geschwenkt und in einer Mikrowelle für circa 30 Sekunden erhitzt wurden, bis sich die Lösung als homogen zeigte. Unter Rühren (Magnetrührer RH Basic 2; IKA®-Werke) musste das Gel abkühlen, bevor 2µl des Fluoreszenz- Farbstoffes Ethidiumbromid (Firma Carl Roth) hinzu pipettiert werden konnten. Das Gel wurde zum Aushärten in ein spezielles Gehäuse mit einem sechzehn zackigen Gelkamm gegossen. Nach 30 Minuten wurde der Gelkamm entfernt, dessen Zacken

die Vertiefungen für die Proben darstellten. Das Gel wurde in der Maschine platziert und mit Puffer (50µl Glycerol und 50µl autoklaviertes Wasser) bedeckt. In den Vertiefungen durften keine Luftblässchen vorhanden sein. Daraufhin wurden 5µl der cDNA Probe mit den jeweiligen zu testenden Primern und 1µl des Farbstoffes (Orange Loading -Dye 6X; Promega) zur Markierung in die Taschen pipettiert. Zudem diente eine Tasche zur Negativkontrolle (autoklaviertes Wasser) und eine weitere für den sogenannten Ladder (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, Massachusetts, USA). Dieser Marker (Ladder) diente als Referenz zur Einschätzung des molekularen Gewichts und der Größe der anderen Fragmente, die eine unterschiedliche Anzahl an Basenpaaren hatten als der Marker.

Die cDNA stammte von Lebergewebe eines Tieres der vorherigen Versuchsreihe.

Zur eigentlichen Elektrophorese wurde die Vorrichtung für 40 Minuten an 70 Volt (Power Pac 300, Bio Rad Laboratories) angeschlossen. Danach wurde das Gel entnommen und zur Analyse unter UV- Licht fotografiert (Gel iX Imager; Intas, siehe Abbildung).

Die für diese Studie relevante Primer (IGF- I, IGFBP-3 und GHR) waren funktionstüchtig. In der Gelelektrophorese waren die entsprechenden Produkte zu sehen (Abb.5).



Von links nach rechts sind folgende Primer abgebildet:

PMK 2, PMK1, MYC, HIF1A, CD36, IGF- BP ALS, IGFBP-3, INSRB, INSR, IGF 2, IGF- I, GHR, INSR beide, negative Kontrolle und Ladder

Abbildung 5: Fotografie der Gelelektrophorese.

2.4.5 Real- time PCR

Theoretische Grundlagen

Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) ist eines der wichtigsten Verfahren der modernen Molekularbiologie. Ziel der drei Arbeitsschritte einer PCR ist das Verdoppeln eines DNA- Stranges, was im besten Fall einer exponentiellen Vervielfältigung entspricht. Benötigt werden hierfür eine Ausgangs- DNA, eine thermostabile DNA- Polymerase, zwei Primer, welche die zu kopierende DNA flankieren, sowie die Nukleotide Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin. Im ersten, sogenannten Denaturierungsschritt wird bei 95° die als Doppelstrang vorliegende DNA aufgetrennt. Im darauffolgenden Annealingschritt lagern sich die zwei Oligonukleotidprimer an ihre komplementären DNA- Abschnitte an. Die Temperatur beträgt 60° Celsius, da die Primer ein individuelles Temperaturoptimum zwischen 55 und 60° Celsius aufweisen. Von den Primern ausgehend wird die dazwischenliegende originale DNA durch die DNA- Polymerase transkribiert und die DNA verdoppelt. Dabei elongiert die Polymerase den neu synthetisierten Strang, indem die zur originalen DNA komplementären Nukleotide verbunden werden. Dies kann beliebig oft wiederholt werden bis genügend Kopien vorliegen.

Bei der auch in dieser Studie angewandten quantitativen real- time PCR (qRT-PCR) wird die Verdoppelung spezifischer Genabschnitte quantifiziert. Als Vorlage für die DNA- Polymerase dient die zuvor synthetisierte cDNA. Die Quantifizierung geschieht mit Hilfe eines die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes, wobei die Fluoreszenz, gemessen nach jedem PCR- Zyklus, mit der Konzentration an vorhandener DNA korreliert. Es gilt, zwischen spezifischen und unspezifischen Farbstoffen zu unterscheiden, wobei die unspezifischen häufiger Anwendung finden (zum Beispiel SYBR Green 1 oder SYBR Gold) [59]. Fluoreszenzfarbstoffe stellen die Grundlage der Quantifizierung dar. Der Zeitpunkt, beziehungsweise der Zyklus, in dem sich das detektierte Fluoreszenzsignal deutlich hervorhebt, wird als cycle Threshold (Ct) bezeichnet. Je mehr Vorlagen des zu kopierenden Genabschnittes auf der Ausgangs- DNA vorhanden sind, desto schneller wird Ct erreicht. Der Ct erlaubt es Wissenschaftlern, verschiedene Gewebeproben auf die Expression bestimmter Genabschnitte hin zu vergleichen. Der Ct muss sorgsam festgelegt werden, um akkurate Daten zu gewinnen und einen exakten Vergleich verschiedener Proben gewährleisten zu können. Liegt der Schwellenwert (threshold) zu niedrig und ist die Fluoreszenz nur schwach ausgeprägt, besteht die Gefahr der Annahme, dass sich mehr exprimierte Genabschnitte auf der Ursprungs- DNA befinden, als tatsächlich vorhanden. Wird der Schwellenwert zu hoch gesetzt, kann sich die Amplifikation schon in der linearen und nicht mehr in der optimalen exponentiellen Phase befinden. Die lineare Vervielfältigung setzt

zwangsläufig ein. Dies beruht entweder auf der Inaktivierung der DNA- Polymerase oder einem Aufbrauchen der Reagenzien (Primer, Nukleotide).

Bei der sogenannten relativen Quantifizierung setzt man die quantitative Expression des Zielgenes in Relation zu einem Haushaltsgen. Haushaltsgene werden unabhängig von äußeren Einflüssen konstant exprimiert, sodass eventuelle Unterschiede in der RNA- Extraktion keinen Einfluss auf das Ergebnis haben, da die Expression von Zielgen und Haushaltsgen im Verhältnis zueinander stehen.

Praktische Anwendung

Die cDNA wurde aufgetaut, zentrifugiert und kühl gehalten, um die Integrität nicht zu gefährden. Die cDNA Proben wurden im Verhältnis 1:25 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Hierfür wurden 8µl der cDNA mit 192 µl nukleasefreiem Wasser in der jeweils rechtsständigen Vertiefung (vgl. Abb. 6) gemischt und zentrifugiert. Die PCR Platten für die real-time PCR wurden beschriftet und auf Eis gekühlt. Für jedes Gen wurde eine eigene Platte angelegt und ein Mastermix aus 10µl 2X Mix (SsoFast EvaGreen Supermix; Biorad) + 0.06µl der beiden Primer pro Reaktion vorbereitet. 10µl der verdünnten cDNA- Proben wurden in Duplikaten auf die Platte übertragen und 10µl des Mastermixes hinzugefügt. Auf jeder Platte wurde das HPRT Gen (Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyltransferase) als sogenanntes housekeeping gene als Referenz zusätzlich amplifiziert. Die Platte wurden mit Plastikdeckeln verschlossen, zentrifugiert und die real- time PCR Schema Evergreen im Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) gestartet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	P33	P33	P41	P41
B	P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	P34	P34	P42	P42
C	P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	P35	P35	P43	P43
D	P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	P36	P36	P44	P44
E	P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	P37	P37	P45	P45
F	P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	P38	P38	P46	P46
G	P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	P39	P39	P47	P47
H	P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32	P40	P40	P48	P48

Abbildung 6: Pippetierschema beispielhaft. P steht für Probe (cDNA- Probe), die Zahlen identifizieren gleiche Proben.

Statistische Analysen

Die statistischen Auswertungen der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten fand mit dem Programm GraphPad Prism 5® (Version 5.01; Graph Pad Software, Inc.) statt.

Nach Testen der Daten auf Normalverteilung wurde zur statistischen Analyse von drei oder mehr Gruppen eine „one-way ANOVA“- Analyse mit anschließendem Bonferroni post- hoc Test durchgeführt. Je nach der von ANOVA angegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit wurden die Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) als signifikant, beziehungsweise bei kleiner 1% ($p < 0,01$) als hoch signifikant angesehen.

Bei den rank plots (in diesem Zusammenhang erstmals beschrieben 2011 von Xu et al. [60]), welche zur Darstellung der Wachstumshormonkonzentrationen verwendet wurden, wurde die statistischen Analyse folgendermaßen durchgeführt:

Für jede Dosisgruppe wurde eine eigene „Area under the curve“ (AUC) bestimmt, welche mit den Daten der anderen Gruppe in einer neuen Tabelle auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnof) geprüft wurde. Waren die Daten parametrisch, wurde ein one way ANOVA mit post-hoc Bonferroni Test angewandt, bei nicht- parametrischen Daten hingegen der Kruskal-Wallis Test mit nachfolgendem Dunn Test.

Zudem wurde für alle Gruppen die Suppression des GH und IGF- I in Prozent umgerechnet. Zu diesem Zweck wurde der Durchschnitt aller Werte einer Gruppe (Vehikel und Dosisgruppen) berechnet. Der Durchschnittswert der Vehikelgruppe diente als Referenz und wurde als 100 Prozent angenommen. Die Durchschnittswerte der Dosisgruppen wurden zu diesem in Bezug gesetzt.

Bei den einmaligen Injektionen wurde zum Vergleich von nur zwei Dosisgruppen der t-Test angewandt. Auch bei den genannten Analysen wurde der p- Wert zur Einschätzung der Signifikanz herangezogen.

In den graphischen Darstellungen wurden statistisch signifikante Gruppenunterschiede mit Buchstaben gekennzeichnet, wobei Gruppen mit demselben Buchstaben nicht signifikante und Gruppen mit unterschiedlichen Buchstaben signifikante Unterschiede aufwiesen.

Alle Daten in dieser Arbeit sind, soweit nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm SD (standard deviation/ Standardabweichung) angegeben. In manchen Gruppen wurden sogenannte Ausreißer aus der Berechnung genommen. Dabei handelt es sich um Daten, die um das Doppelte der Standardabweichung vom Mittelwert abwichen und somit das Ergebnis zu sehr verzerrten. Dieser Ausreißer wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5® (Version 5.01; Graph Pad Software, Inc.) errechnet, beziehungsweise bei den rank plots mit einer online zugänglichen

zusätzlichen Graphpad Software (outlier calculator [61]). Diese Ausreißer sind bei den jeweiligen Gruppen angegeben.

3 Ergebnisse

Die erhobenen Ergebnisse werden der folgenden Struktur nach vorgestellt: Zuerst werden die Gruppen der kurzwirksamen SSA gelistet, hierbei erst die Pasireotid Gruppe, gefolgt von der Octreotid Gruppe. Danach folgen die Ergebnisse der langwirksamen Präparate in der Reihenfolge PAS LAR, daraufhin OCT LAR.

3.1 Körper- und Organgewichte

3.1.1 Short acting Somatostatin Analoga nach einmaliger und mehrmaliger Injektion

3.1.1.1 Pasireotid

A, Körpergewicht

Es ist zu erwarten, dass gesunde Ratten (und damit die vehikelbehandelten Tiere) in der untersuchten Altersgruppe stetig an Gewicht zunehmen. Daher wurden deren Gewichtsveränderungen mit denen der mit SSA behandelten Tiere verglichen.

Die Daten der Balkendiagramme wurden während den Messungen vor der letzten Injektion erhoben, während die Graphen der Fünf- Tage- Gruppen einen Verlauf mit jeweiliger Gewichtszunahme oder Abnahme widerspiegeln (siehe Abb.7).

Die Gewichtszunahme der Tiere, welche kurz wirksames Pasireotid einmalig oder konsekutiv über fünf Tage erhielten, zeigte nur signifikante Gruppenunterschiede auf, wenn man die Versuchsgruppe mit einmaliger Injektion (Vehikel oder 10µg/kg) mit den Gruppen nach zehnmahliger Injektion verglich. Innerhalb der Gruppen, welche verschiedene Dosen zehnmal injiziert bekamen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb.7).

Das im Vergleich zu den Tieren nach einmaliger Injektion signifikant höhere Gewicht der Ratten, welche 10 Injektionen erhalten hatten, beruhte auf der längeren Versuchsdauer.

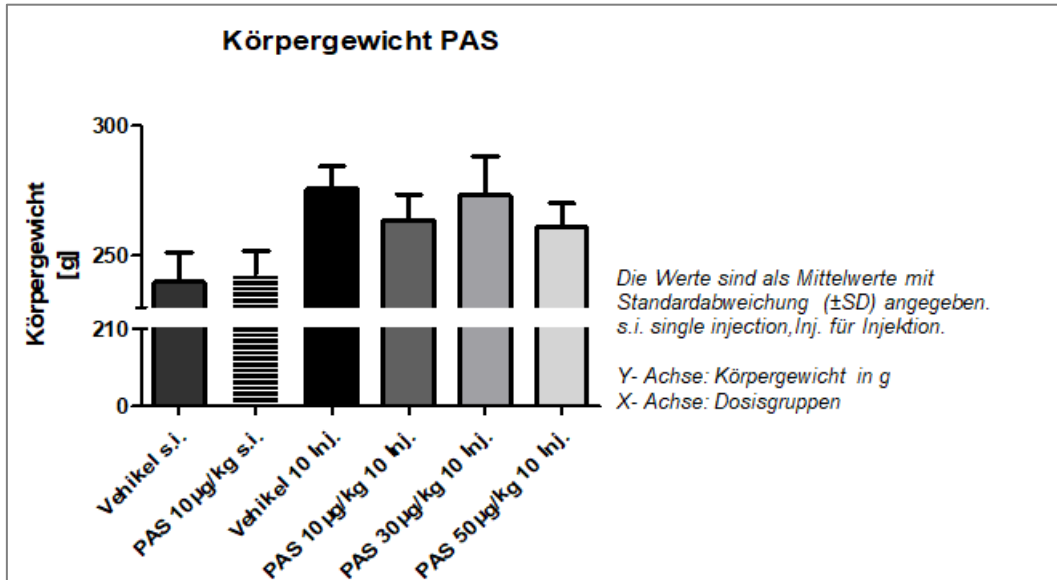


Abbildung 7: Körpergewichte der 1 und 10 Injektionen Gruppen.

Fünf- Tage- Gewichtsverlauf der 10 Injektionsgruppen (Abb.8) zeigt, dass die Tiere der Vehikelgruppe stetig an Gewicht zulegten (Mittelwerte an Tag 1,3 und 5: $262,4 \pm 8,5$ g / $270,5 \pm 8,5$ g / $275,9 \pm 8,6$ g). Auch der Graph, der die Daten der Tiere mit $30\mu\text{g/kg}$ abbildet, spiegelt bis zu Tag fünf ansteigende Grammzahlen wider, allerdings lagen die Mittelwerte stets unterhalb derer der Vehikelgruppe (Mittelwerte der $30\mu\text{g/kg}$ Gruppe an Tag 1,3 und 5: $265,8 \pm 14,0$ g / $268,0 \pm 12,5$ g / $273,2 \pm 15,1$ g). Im Vergleich dazu verbindet der Graph der $50\mu\text{g/kg}$ tendenziell abfallende Grammzahlen; die Mittelwerte lagen deutlich, aber statistisch noch nicht signifikant unter denen der Vehikelgruppe (Mittelwerte der $50\mu\text{g/kg}$ Gruppe an Tag 1,3 und 5: $262,6 \pm 10,0$ g / $259,9 \pm 10,4$ g / $261,2 \pm 9,1$ g).

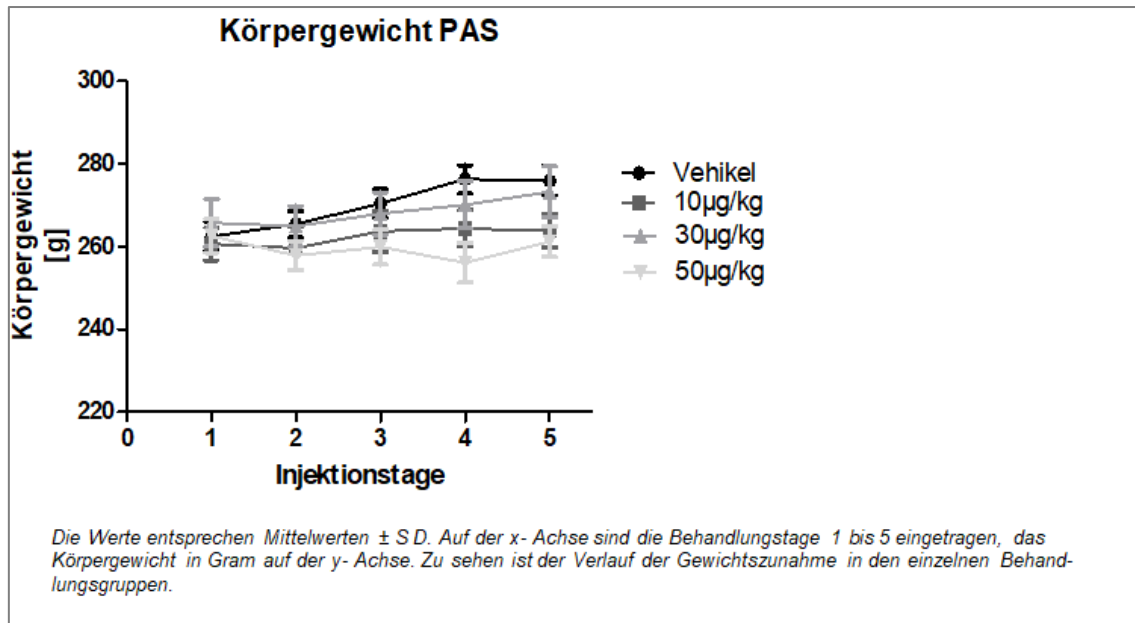


Abbildung 8: Körpergewichte fünf Tage Gruppen unter kurzwirksamem Pasireotid.

B, Organgewichte

Die Tiere der Vehikelgruppe (10 Injektionen) wiesen im Mittel ein signifikant ($p=0,0161$) höheres Lebergewicht im Vergleich zur 10µg/kg Dosisgruppe (10 Injektionen; $10,1 \pm 0,7$ g vs. $9,1 \pm 0,3$ g) auf. Alle anderen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Vehikelgruppe auf.

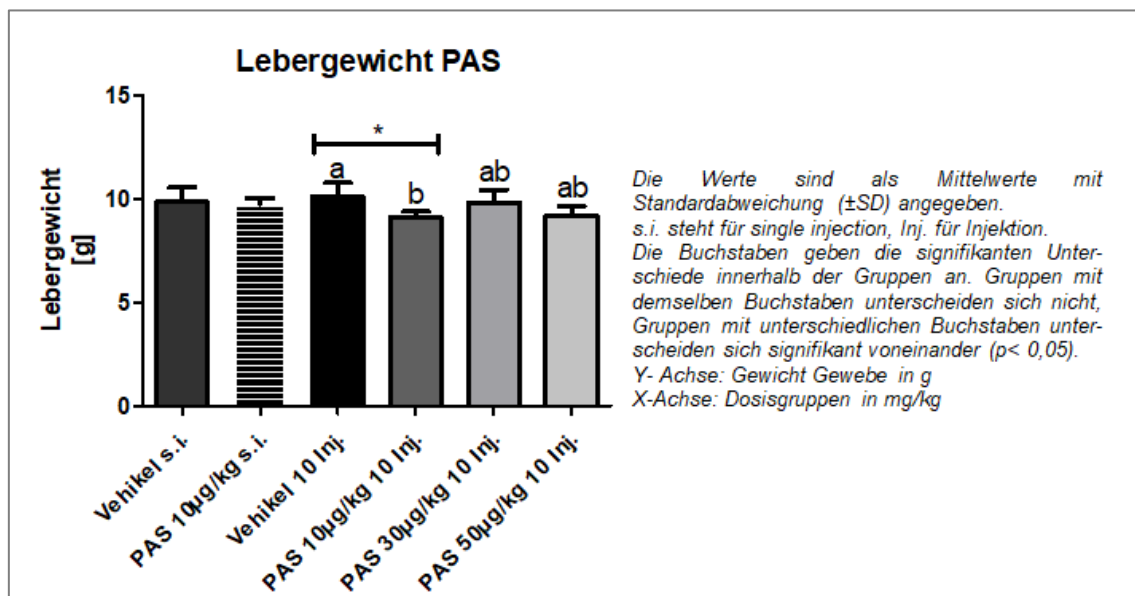


Abbildung 9: Lebergewicht der 1 und 10 Injektionen PAS Gruppen.

Beim Vergleich des Gewichts der perirenal Fettdepots (Abb. 10) war ein signifikanter Unterschied ($p=0,0024$) zwischen der Gruppe mit 10 Injektionen von $30\mu\text{g/kg}$ und der mit $50\mu\text{g/kg}$ feststellbar.

Nach zehnmaliger Injektion von $30\mu\text{g/kg}$ zweimal pro Tag betrug der Mittelwert des Gewichtes des perirenal Fettgewebes $1,1\text{g} (\pm 0,1\text{ g})$. Bei Erhöhung der Dosis auf $50\mu\text{g/kg}$ sank der Gruppenmittelwert auf $0,79\text{g} (\pm 0,08\text{ g})$.

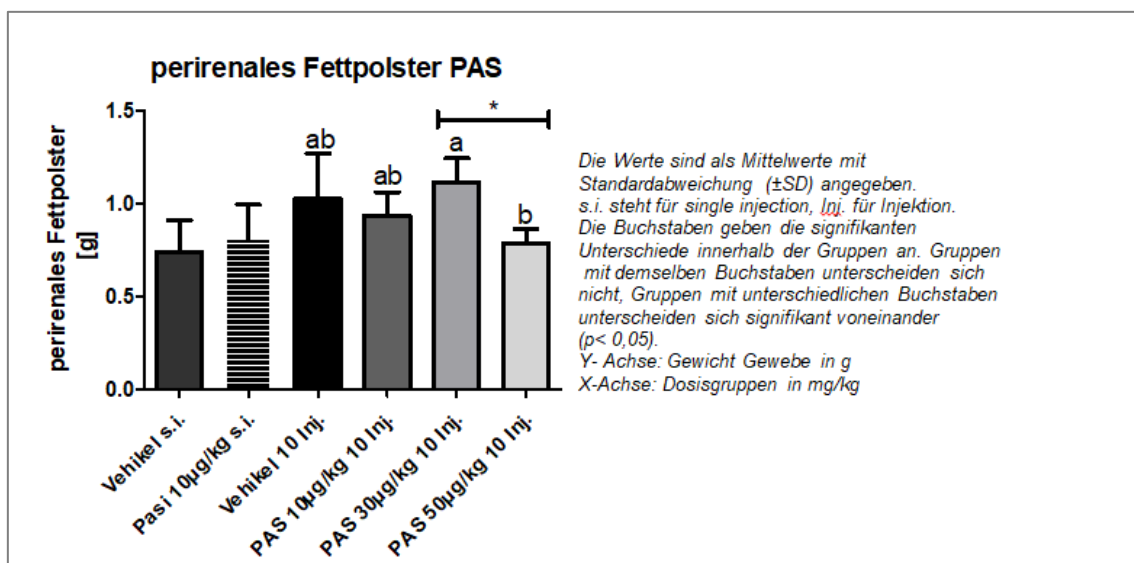


Abbildung 10: Gewicht perirenales Fettpolster nach 1 und 10 Injektionen.

Nach Eröffnung des Skrotums wurde der linke Hoden mit Nebenhoden freigelegt, das Vas deferrens entfernt und das epididymale Fettdepot exzidiert und gewogen. Die Fettdepots der unterschiedlichen Gruppen, welche kurzwirksames Pasireotid erhielten, unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb.11). Das Gewicht betrug nach 10 Injektionen des Vehikels $1,0 \pm 0,1\text{g}$ und nach 10 Injektionen von $50\mu\text{g/kg}$ $0,9 \pm 0,06\text{g}$.

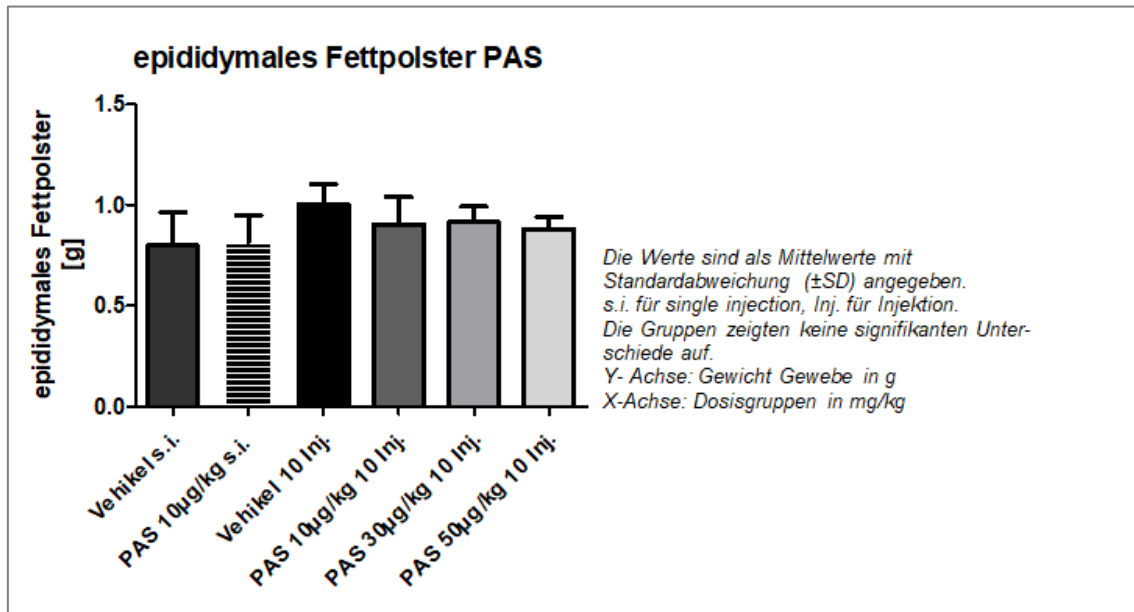


Abbildung 11: Gewicht epididymales Fettpolster der kurzwirksamen PAS Gruppen.

3.1.1.2 Octreotid

A, Körpergewicht

Die Tiere wurden auch bei diesem Teilexperiment vor jeder Injektion gewogen, sodass bei der Fünf- Tage- Gruppe wiederum ein longitudinaler Gewichtsverlauf dargestellt werden kann (Abb.13). Die unterschiedliche Zunahme an Körpergewicht war gegenüber der Vehikelgruppe nicht signifikant (Abb.12). Die Mittelwerte betrugen nach 10 Injektionen bei den Versuchstieren $246,4 \pm 14,8$ g (Vehikel) und $230,3 \pm 12,1$ g ($50\mu\text{g/kg}$).

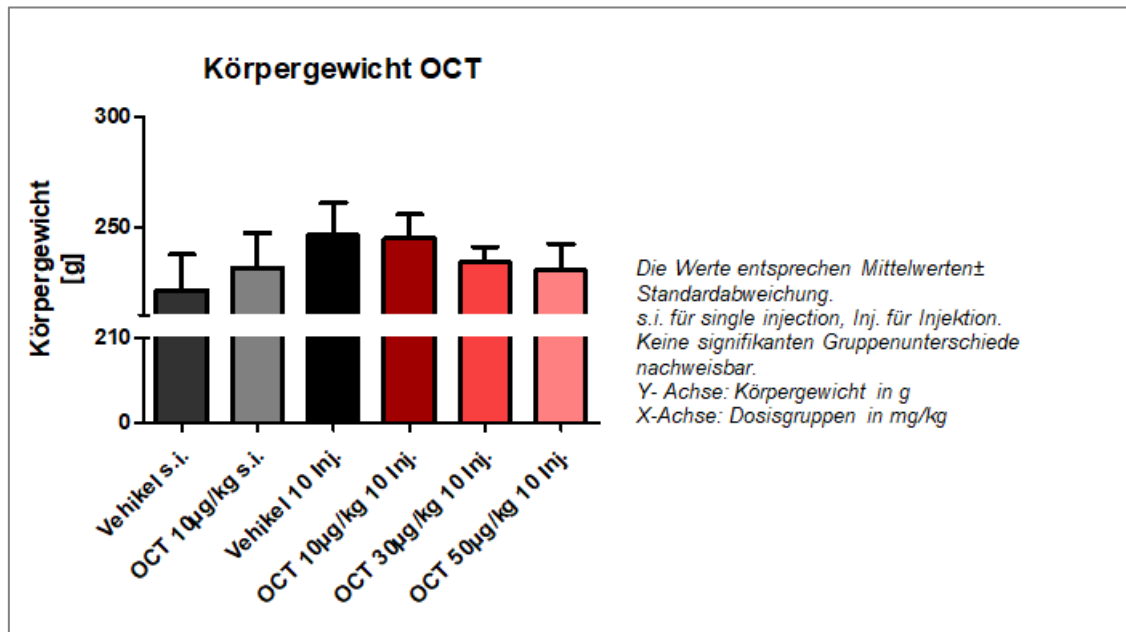


Abbildung 12: Körpergewichte nach einer bzw. 10 Injektionen.

Bei genauer Betrachtung der Graphen (Abb.13), die die fünf Tagesverläufe darstellen, fällt auf, dass die Tiere der 10µg/kg- Gruppe kontinuierlich ansteigende Grammzahlen aufweisen, während die Körpergewichte der 50µg/kg- Gruppe ab Tag drei abfallen und damit eine Gewichtsabnahme vorliegt. Im Vergleich wogen die Tiere der Vehikelgruppe am Tag fünf im Mittel $246,4 \pm 14,8$ g, die Tiere der 30µg/kg-Gruppe $234,1 \pm 7,0$ g, während die Tiere der 50µg/kg-Gruppe am fünften Tag nur noch $230,3 \pm 12,1$ g wogen. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

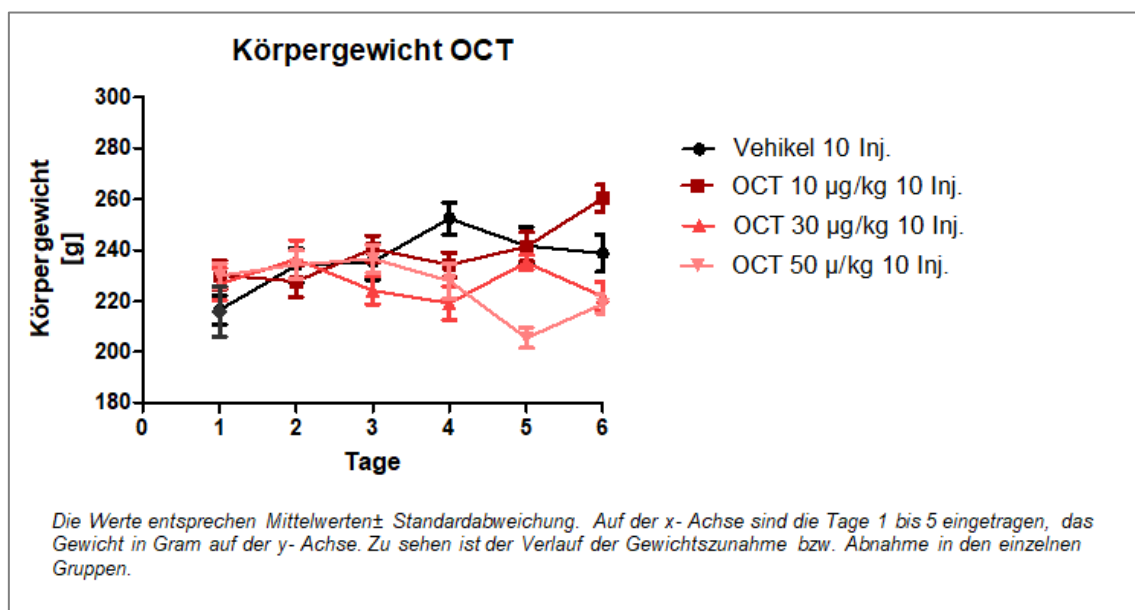


Abbildung 13: Körpergewichte fünf Tage Gruppen unter kurzwirksamem Octreotid.

B, Organgewichte

Das Balkendiagramm der Lebergewichte (Abb.14) veranschaulicht, dass sich kaum Unterschiede in den Mittelwerten aufzeigten. Eine statistische Signifikanz gegenüber den Tieren der Vehikelgruppe war dementsprechend nicht nachweisbar. Das Durchschnittsgewicht der mit Vehikel behandelten Tiere betrug $9,2 \pm 0,5$ g, nach $50 \mu\text{g/kg}$ zweimal pro Tag über fünf Tage $7,6 \pm 1,2$ g. Die Werte der $10 \mu\text{g/kg}$ und $30 \mu\text{g/kg}$ lagen abgestuft dazwischen.

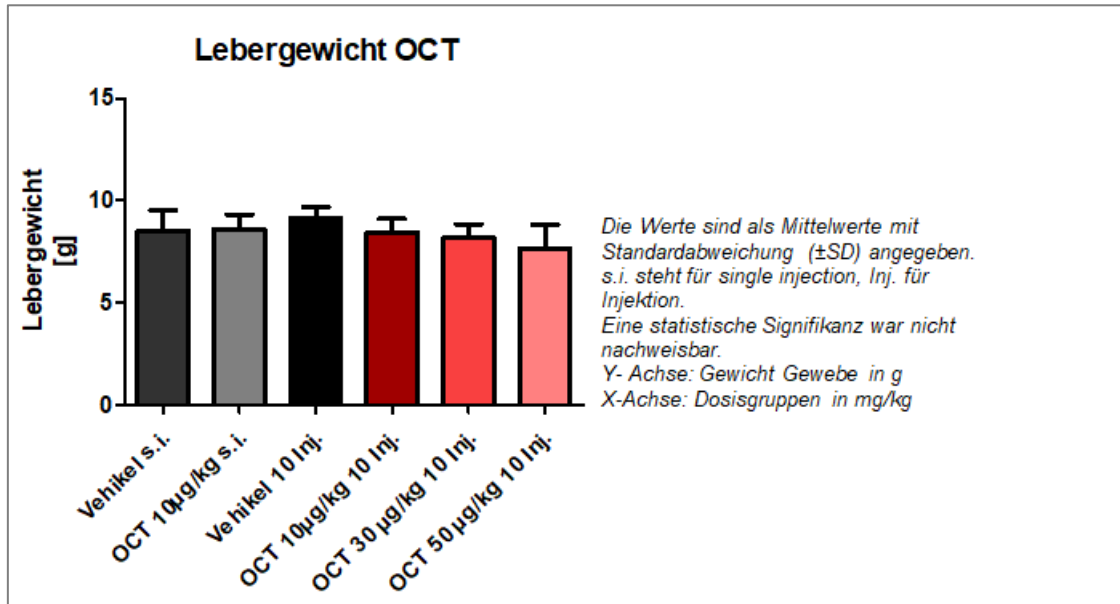


Abbildung 14: Lebergewicht der kurz-wirksamen OCT Gruppen.

Beim Vergleich der perirenal Fettdepots ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen zwei Behandlungsgruppen innerhalb der Versuchsreihe mit 10 Injektionen. Die Versuchstiere nach zehnmaliger Injektion von $10 \mu\text{g/kg}$ hatten Fettdepots mit einem Gewicht von $0,7 \pm 1$ g. Die Tiere der $50 \mu\text{g/kg}$ - Gruppe zeigten vermindertes perirenales Fettgewebe von $0,5 \pm 0,1$ g (Abb.15).

In Abbildung 15 nicht dargestellt sind die signifikanten Unterschiede zwischen Vehikel s.i. (single injection) und Vehikel 10 Injektionen ($p < 0,05$), zwischen der Versuchsgruppe Vehikel s.i. und Octreotid $10 \mu\text{g/kg}$ zehnmal ($p = 0,0015$), sowie zwischen Octreotid s.i. und Octreotid $10 \mu\text{g/kg}$ nach zehn Injektionen.

Der Wert des fünften Tieres ($1,022$ g) aus der Vehikel 10inj.- Gruppe musste als Ausreißer herausgenommen werden.

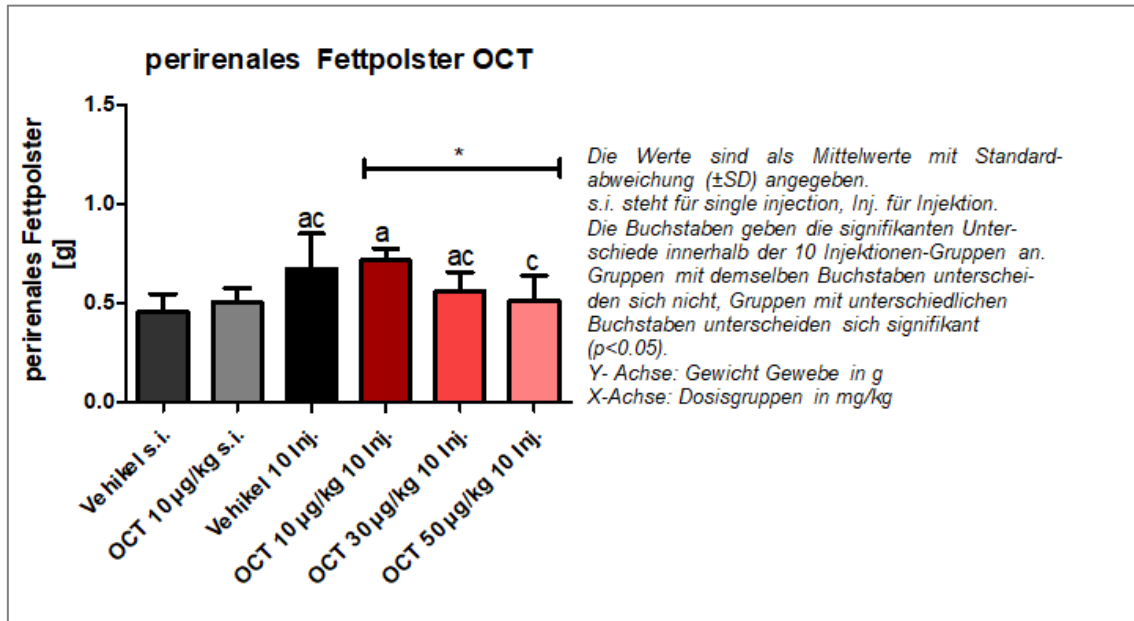


Abbildung 15: Gewicht perirenales Fettpolster der kurzwirksamen OCT Gruppen.

Die beiden Versuchsgruppen, welche Vehikel einmalig oder zehnmals erhielten, zeigten beim Vergleich des epididymalen Fettdepots einen signifikanten Unterschied auf ($p=0,0226$) (Abb.16). Es zeigte sich eine leichte Verminderung bei den Tieren der 30- und 50µg/kg-Gruppe; Die Mittelwerte lagen bei $0,7 \pm 0,09$ g (10µg/kg), $0,6 \pm 0,1$ g (30µg/kg) und $0,6 \pm 0,1$ g (50µg/kg).

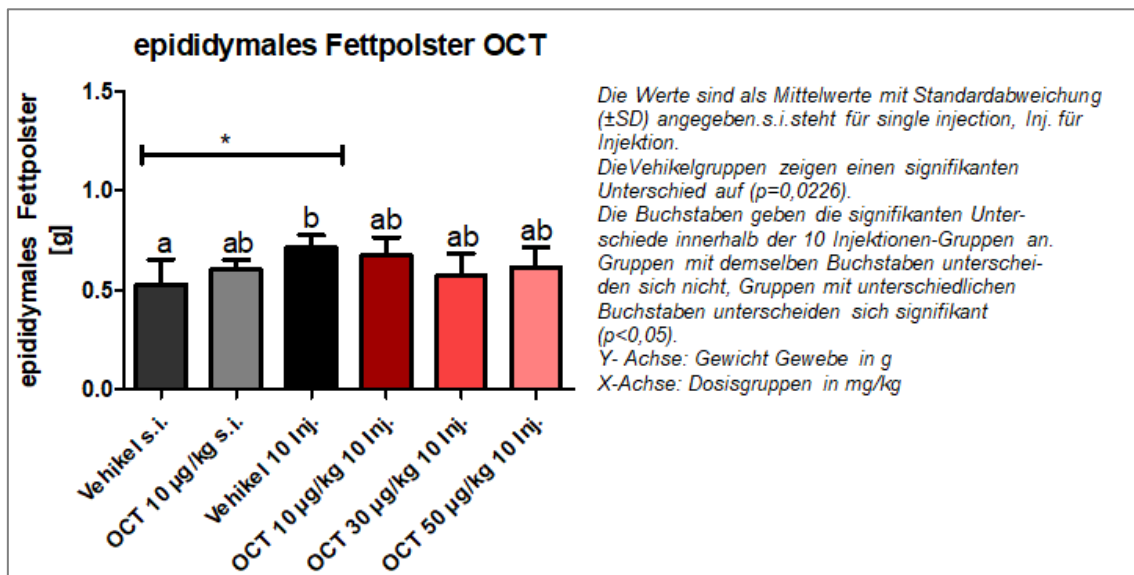


Abbildung 16: Gewicht epididymales Fettpolster der kurzwirksamen OCT Gruppen.

3.1.2 Long acting Somatostatin Analoga (LAR) 24 Stunden nach Injektion

3.1.2.1 Pasireotid-LAR und Pasireotid-LAR niedrige Dosis

A, Körpergewicht

Das Gewicht der Versuchstiere, welche verschiedene Dosen des langwirksamen Pasireotid erhielten (4,8, oder 80mg/kg) zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p=0,0662$) zwischen den Gruppen (Abb.17). Der Gewichtsmittelwert 24 Stunden nach Vehikelinjektion betrug $249,9 \pm 9,7\text{g}$, 24 Stunden nach Injektion von 80mg/kg lag er bei $239,3 \pm 14,1\text{g}$.

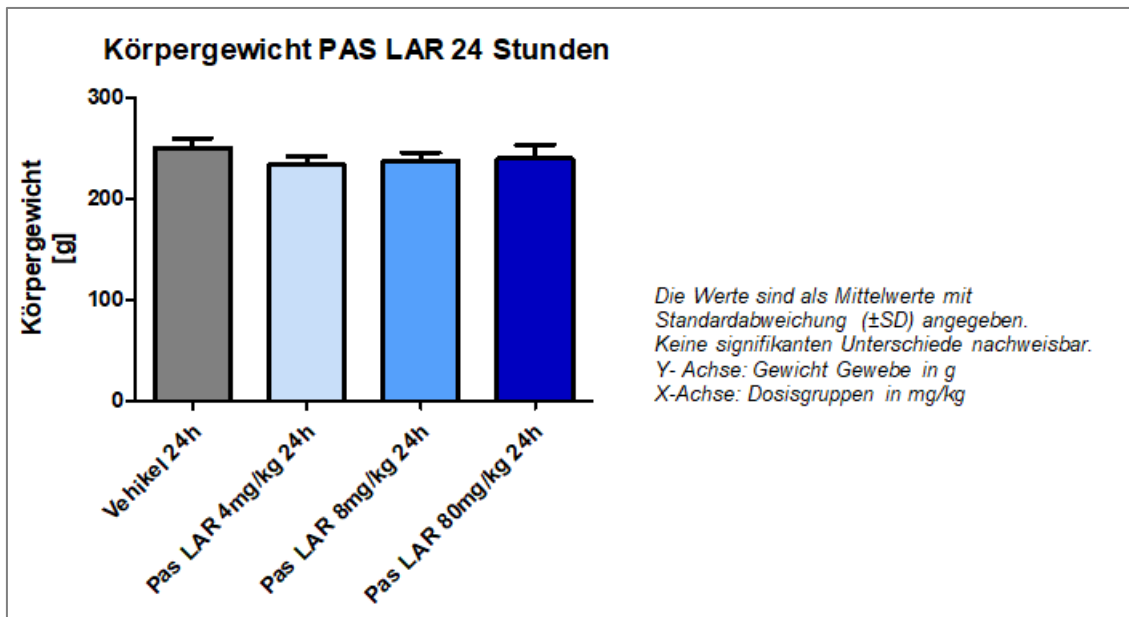


Abbildung 17: Körpergewicht Pasireotid-LAR 24h nach Injektion.

Auch bei den Versuchstieren, die niedrigere Dosen an Pasireotid- LAR erhielten (0,1, 0,5 und 1,0mg/kg), war nach 24 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Körpergewichten nachweisbar (Abb.18). Die Tiere, welche 0,5mg/kg erhielten, waren nach 24 Stunden etwas leichter ($270,4 \pm 12,7\text{g}$) als die Tiere, welche 1,0mg/kg erhalten hatten ($288,0 \pm 10,8\text{g}$). Der Unterschied ist mit $p>0,05$ nicht signifikant.

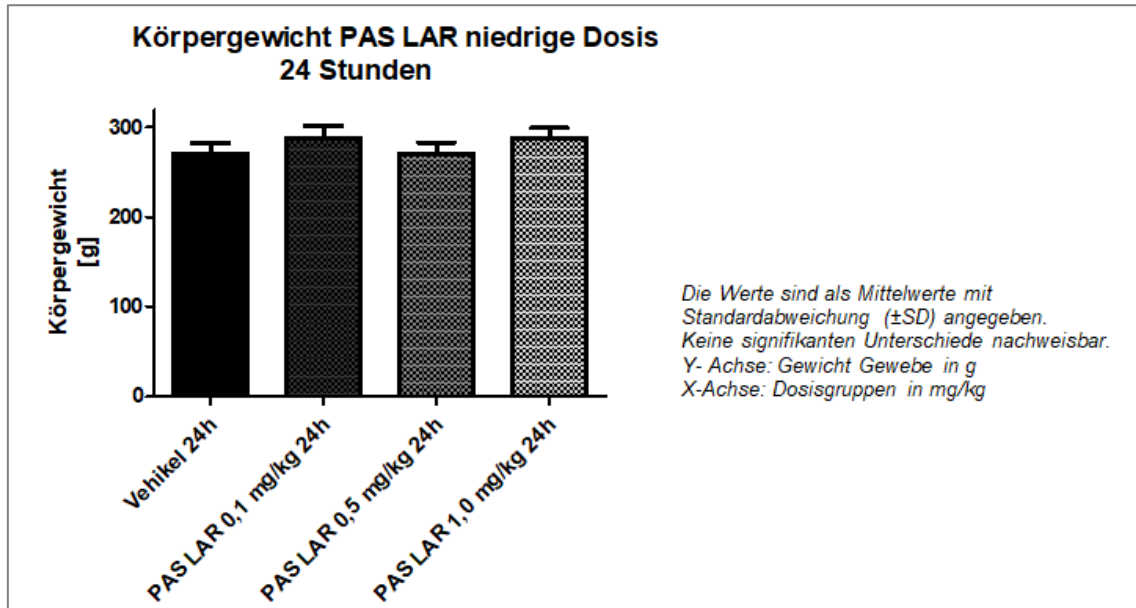


Abbildung 18: Körpergewicht Pasireotid-LAR niedrige Dosis 24h nach Injektion.

B, Organgewichte

Das Lebergewicht der Versuchstiere, die den Vehikel injiziert bekamen, unterschied sich signifikant von allen Dosisgruppen mit $p < 0,05$ (Abb.19). Die Lebern der Vehikelgruppe wogen im Mittel $9,4 \pm 0,7$ g, während die anderen Ratten $7,2 \pm 0,4$ g (4mg/kg), $7,5 \pm 0,6$ g (8mg/kg) und $8,0 \pm 0,7$ g (80mg/kg) wogen. Die verschiedenen Behandlungsgruppen, welche Pasireotid-LAR in unterschiedlichen Dosen bekamen, unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

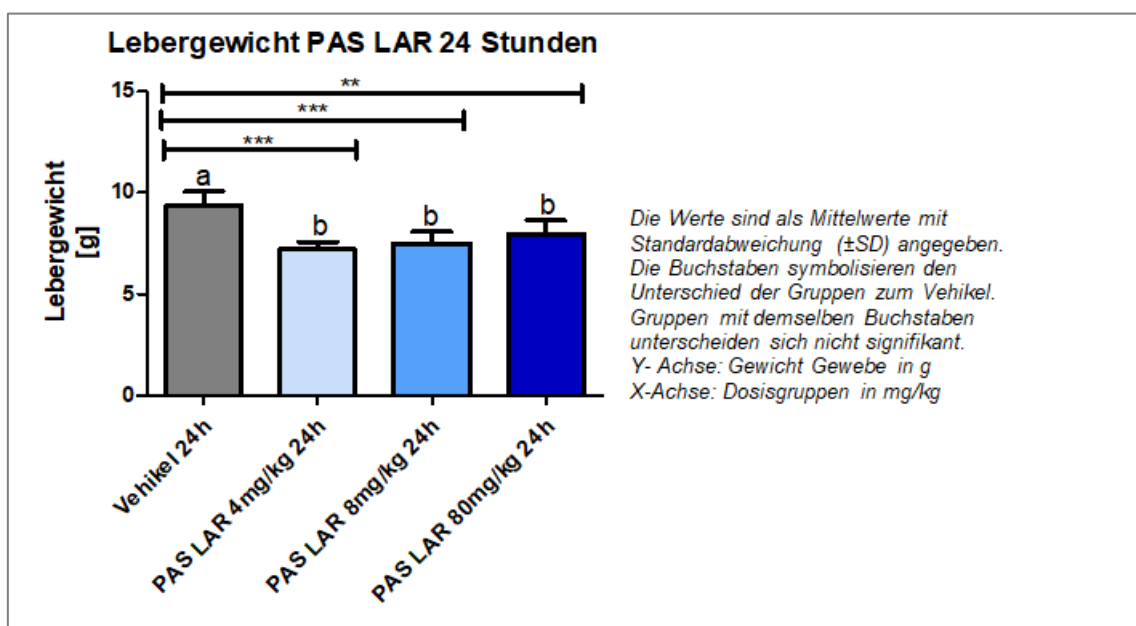


Abbildung 19: Lebergewichte Pasireotid-LAR 24h nach Injektion.

Die Behandlungsgruppen, die niedrigere Dosen an Pasireotid-LAR erhalten hatten (0,1, 0,5 und 1,0mg/kg) unterschieden sich hinsichtlich der Lebergewichte nicht signifikant von der Vehikelgruppe (Abb.20).

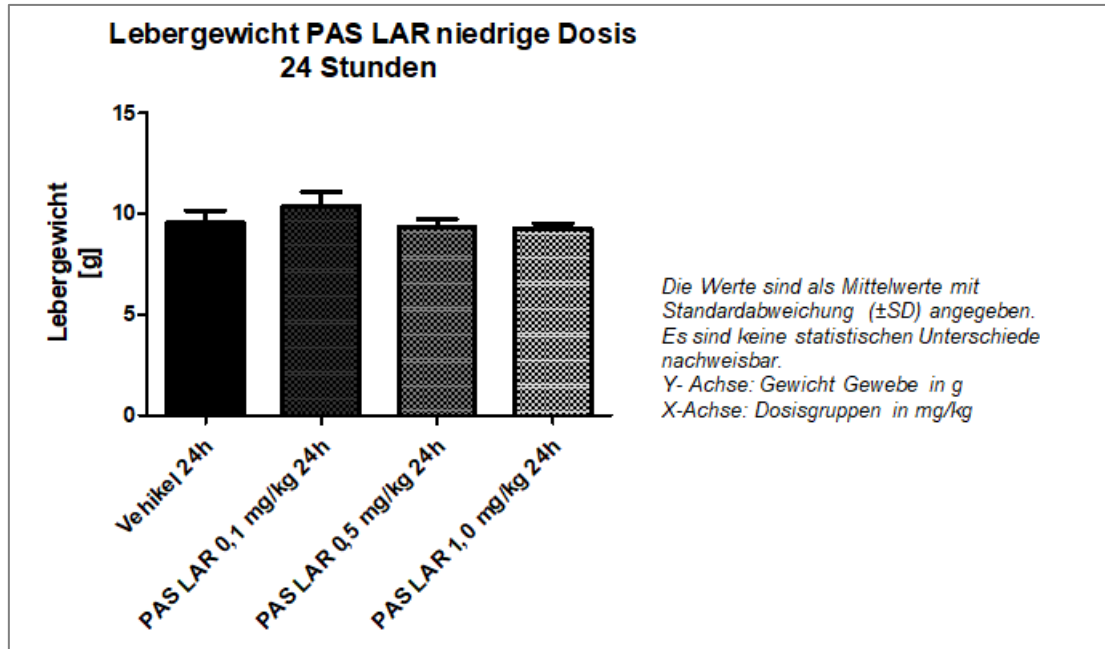


Abbildung 20: Lebergewichte Pasireotid-LAR niedrige Dosis 24h nach Injektion.

Die perirenal Fettdepots unterschieden sich hinsichtlich des Gewichtes 24 Stunden nach Behandlungsbeginn weder innerhalb der Behandlungsgruppen, welche 4mg/kg, 8mg/kg oder 80mg/kg erhalten, noch bei denen, die die niedrigeren Dosen von 0,1mg/kg, 0,5mg/kg oder 1,0mg/kg Pasireotid LAR injiziert bekommen hatten, signifikant (Abb. 21 und 22).

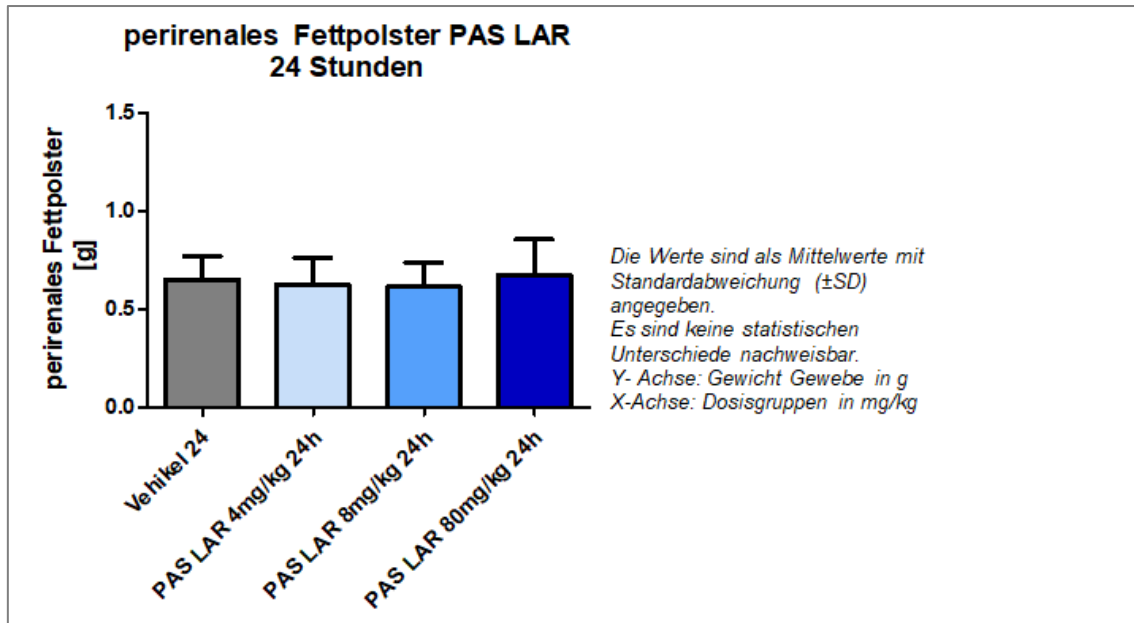


Abbildung 21: Gewicht perirenale Fettdepots Pasireotid-LAR 24h nach Injektion.

Das Balkendiagramm der Gruppen mit niedrig dosiertem PAS LAR zeigte leichte Gewichtsunterschiede, welche allerdings nicht signifikant waren. Einen Überblick der Mittelwerte der perirenal Fettdepots mit Standardabweichung gibt Tabelle 9.

Behandlung	Vehikel	0,1mg/kg	0,5mg/kg	1,0mg/kg
Gewicht \pm SD	0,7 \pm 0,2g	0,9 \pm 0,3g	0,70 \pm 0,2g	0,9 \pm 0,1g

Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) angegeben. Es sind keine statistischen Unterschiede nachweisbar.

Tabelle 9: Gewicht perirenale Fettdepots 24h nach Injektion des niedrig dosierten Pasireotid-LAR .

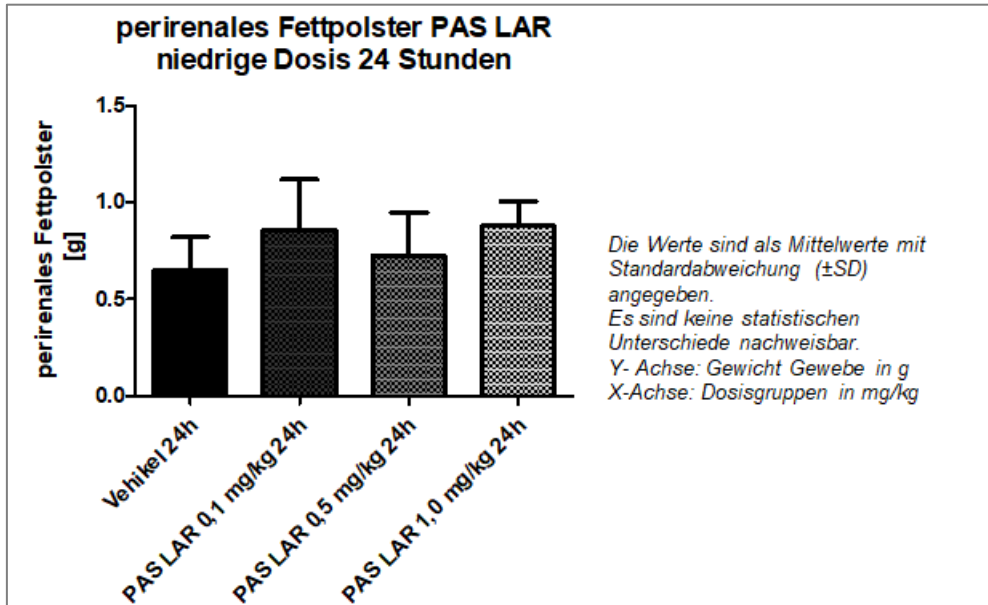


Abbildung 22: perirenale Fettdepots 24h nach Injektion niedrig dosiertes Pasireotid- LAR.

Hinsichtlich einer Veränderung des Gewichtes des epididymalen Fettdepots ergaben sich in beiden Telexperimenten (Pasireotid LAR und Pasireotid LAR niedrige Dosis, Abb.23) über 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede ($p > 0.05$).

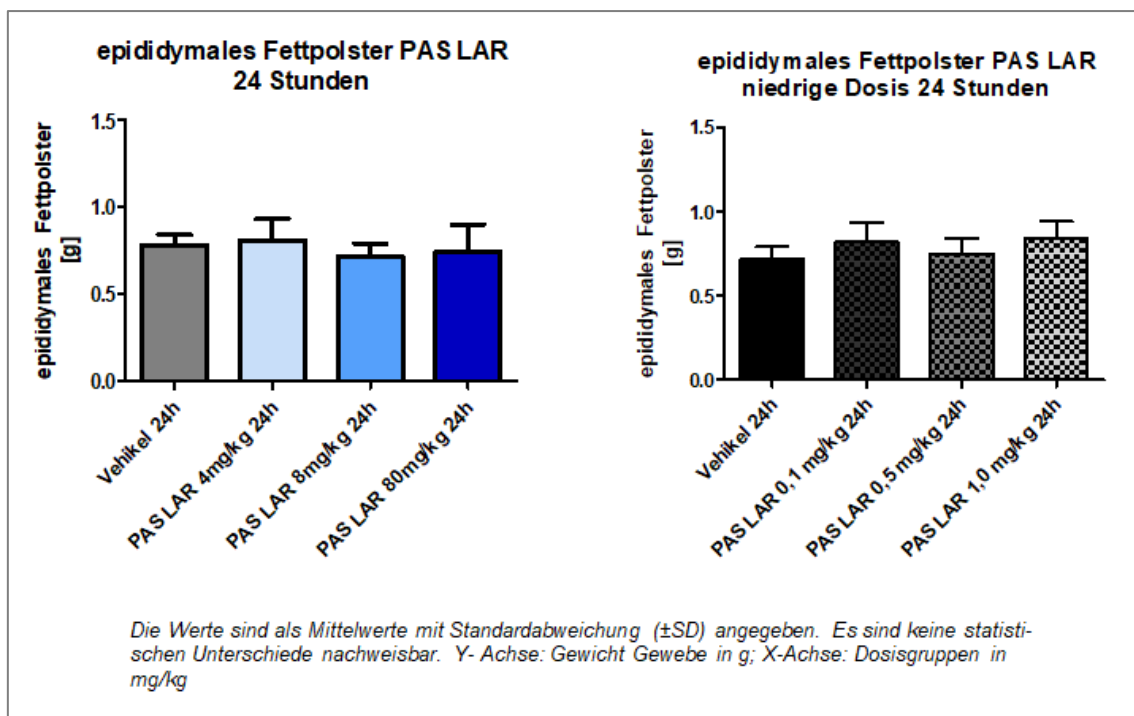


Abbildung 23: epididymale Fettdepots Pasireotid-LAR (links) und niedrige Dosis (rechts) 24h nach Injektion.

3.1.2.2 Octreotid-LAR

A, Körpergewicht

Die Behandlungsgruppen, welche verschiedene Dosen Octreotid LAR erhielten (Vehikel, 4,8 oder 80mg/kg), unterschieden sich hinsichtlich des Körpergewichts nicht signifikant (Abb.24).

Die Mittelwerte lagen bei 269,8±12,5g (Vehikel), 276,6±7,3g (4mg/kg), 265,0±8,6g (8mg/kg) und 266,7±17,3g (80mg/kg).

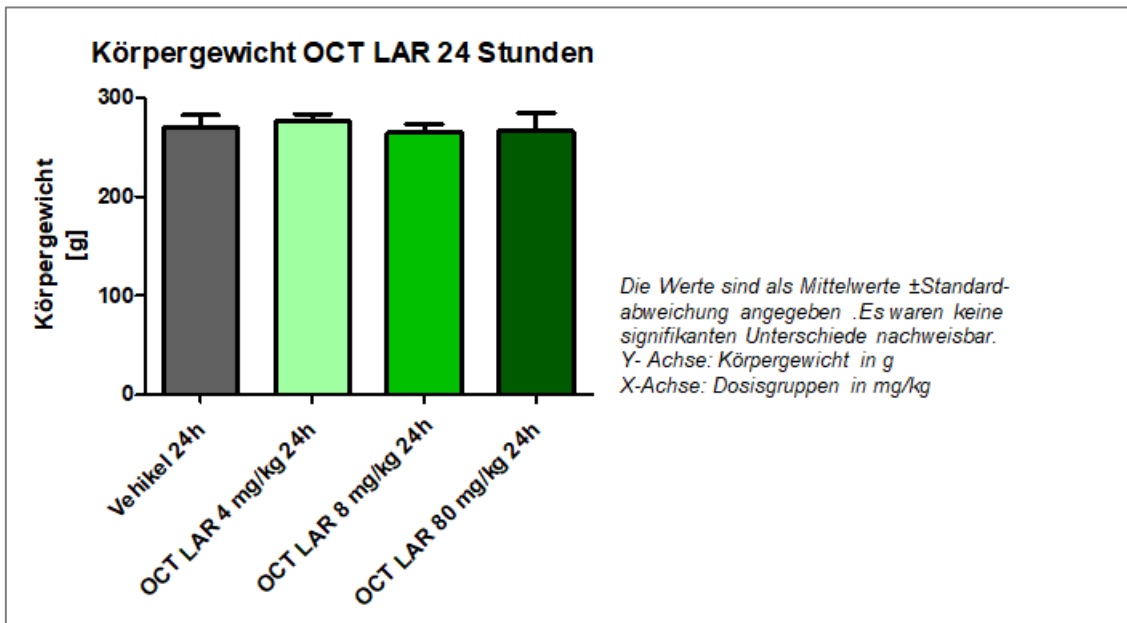


Abbildung 24: Körpergewicht OCT LAR 24h.

Hinsichtlich des Lebergewichts ergab sich ein Unterschied zwischen der Behandlungsgruppe, die einmal 4mg/kg bekam signifikant von jener, die eine Injektion von 80mg/kg erhalten hatte (Abb.25). Die Versuchstiere der 4mg/kg Gruppe wogen im Mittel 10,3±0,5g, die Tiere der 80mg/kg Gruppe 8,9±0,8g. Die beiden anderen Behandlungsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede auf.

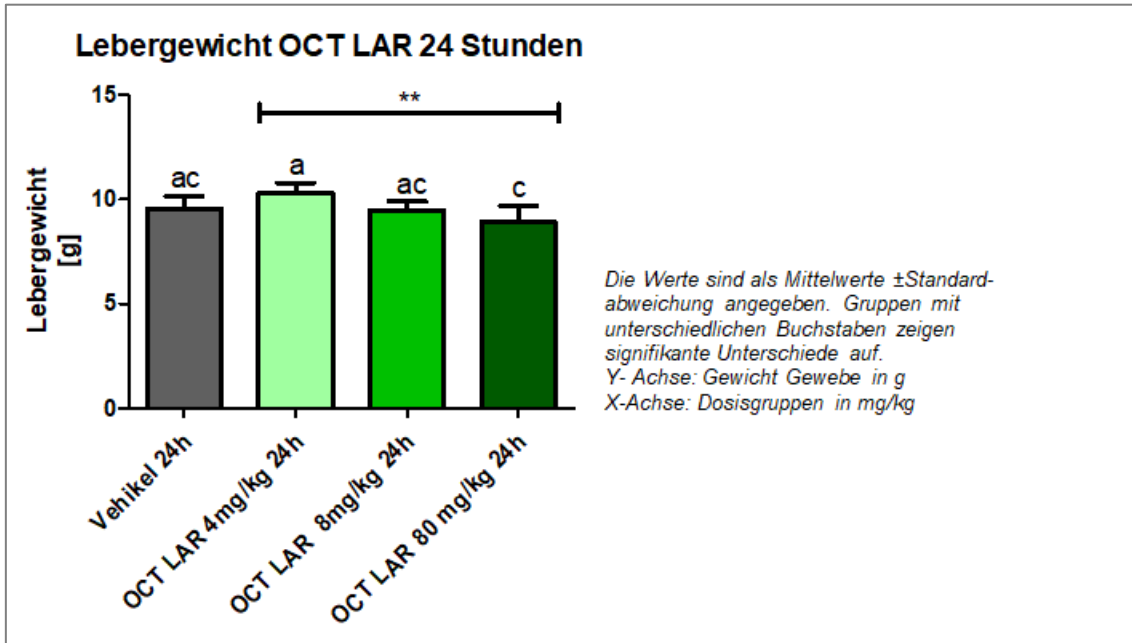


Abbildung 25: Lebergewicht OCT LAR 24h.

Die Unterschiede im Vergleich der perirenal Fettdepots waren nicht signifikant ($p > 0,05$). Es wurde ein Wert aus der Gruppe mit den Versuchstieren, welche 4mg/kg erhalten hatten, aus der Berechnung genommen, da es sich um ein unverhältnismäßig hohes Gewicht handelte. Der Mittelwert dieser Gruppe betrug $0,9 \pm 0,1$ g ohne den Ausreißer, $1,0 \pm 0,2$ g mit dem hohen Wert.

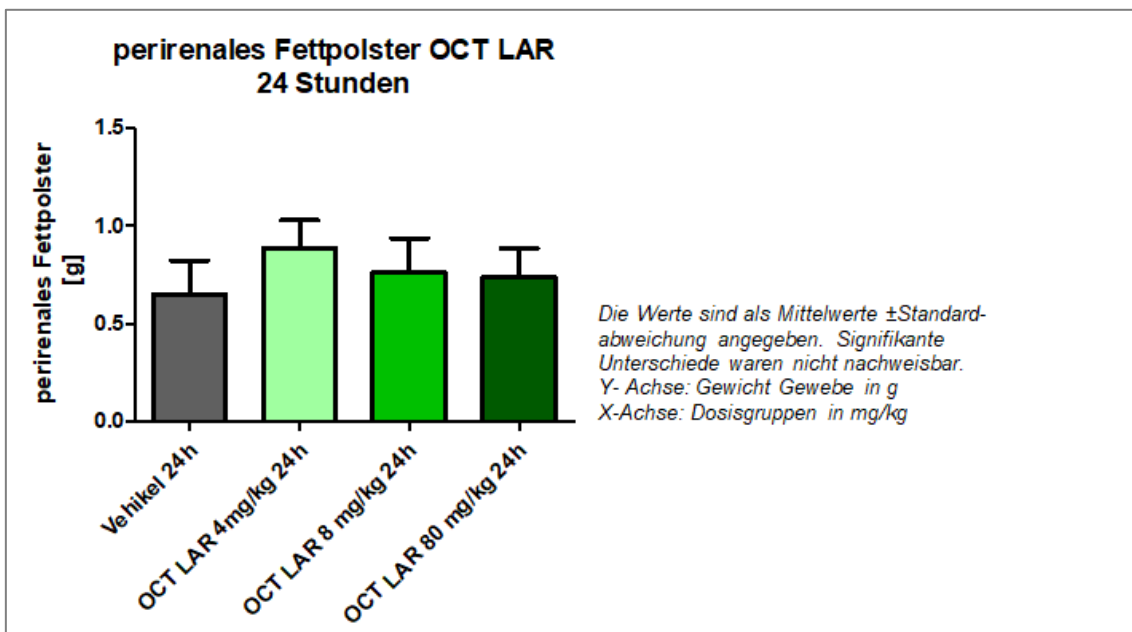


Abbildung 26: perirenales Fettdepot OCT LAR 24h.

Die epididymalen Fettdepots der Gruppen, die entweder Vehikel, 4mg/kg, 8mg/kg oder 80mg/kg long- acting Octreotid injiziert bekommen hatten, zeigten nach 24 Stunden keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (Abb.27).

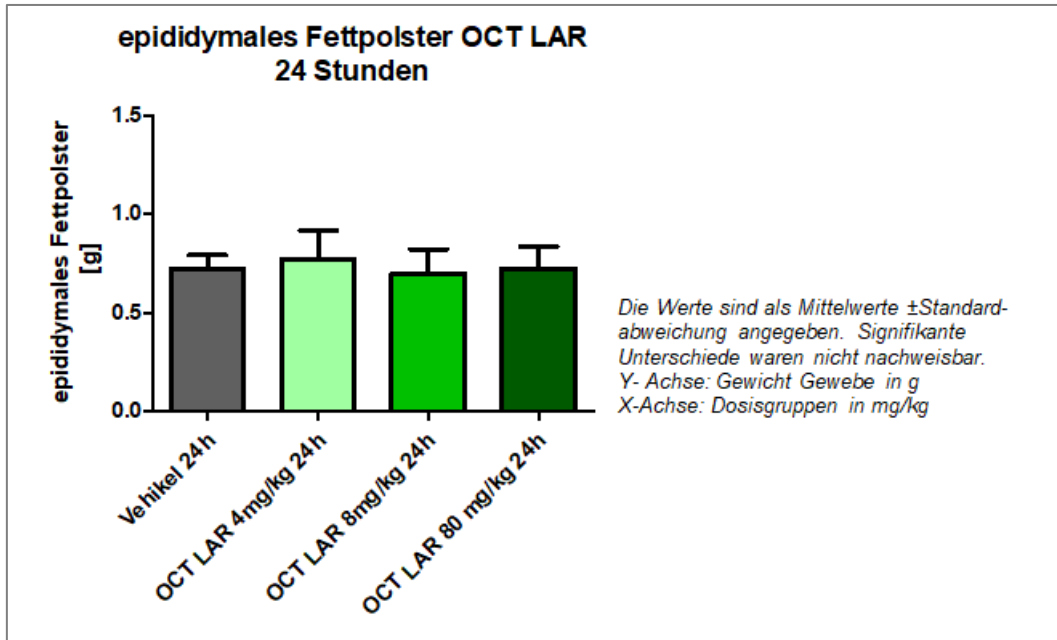


Abbildung 27: Gewicht epididymale Fettdepots 24h nach OCT LAR Injektion.

3.1.3 Long acting Somatostatin Analoga (LAR) 14 Tage nach Injektion

3.1.3.1 Pasireotid-LAR

14 Tage nach einmaliger Injektion von PAS-LAR (Abb.28) zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) zwischen Vehikel und allen anderen Dosisgruppen (4,8 und 80mg/kg). Die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen sind in Tabelle 10 zu sehen.

Behandlung	Vehikel	4mg/kg	8mg/kg	80mg/kg
Gewicht± SD	290,1.0±16,7g	225,0±13,5g	216,7±6,4g	220,3±11,5g

Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SD) angegeben. Die Vehikelgruppe ist statistisch signifikant schwerer, als die Dosisgruppen ($p < 0,0001$).

Tabelle 10: Körpergewichte 14 Tage nach Pasireotid-LAR Injektion.

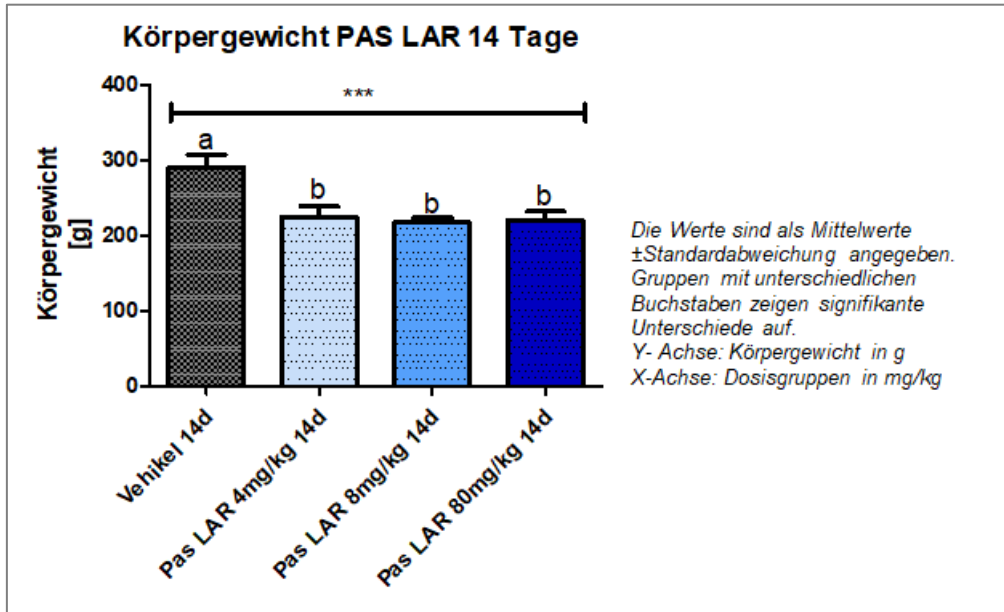


Abbildung 28: Körpergewicht PAS LAR 14d.

In Abbildung 29 sind die stetige Körpergewichtszunahme der Vehikelgruppe und die Gewichtsabnahme der anderen Dosisgruppen zu sehen. Die Dosisgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

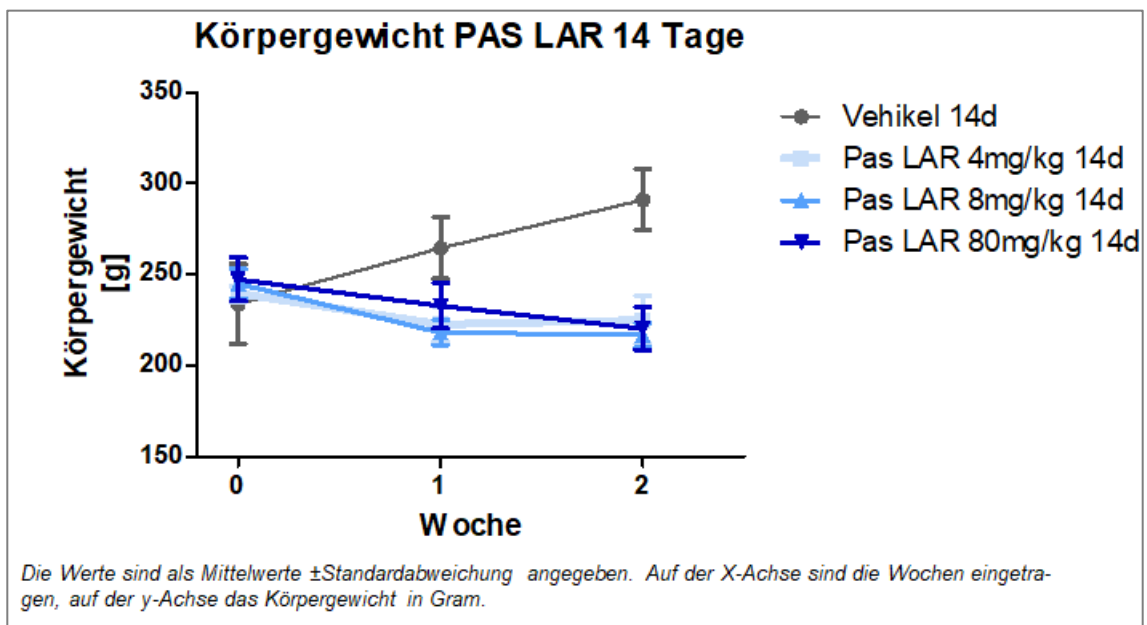


Abbildung 29: Körpergewicht Zunahme über 14d nach PAS LAR Injektion.

Das durchschnittliche Lebergewicht zeigte signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) zwischen Vehikel und den Dosisgruppen. Die Dosisgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 30). Das Gewicht der Vehikelgruppe lag bei $10,3 \pm 0,7$ g, die 4mg/kg Gruppe bei $7,3 \pm 0,9$ g, 8 und 80mg/kg bei $6,6 \pm 0,4$ g und $7,0 \pm 0,4$ g.

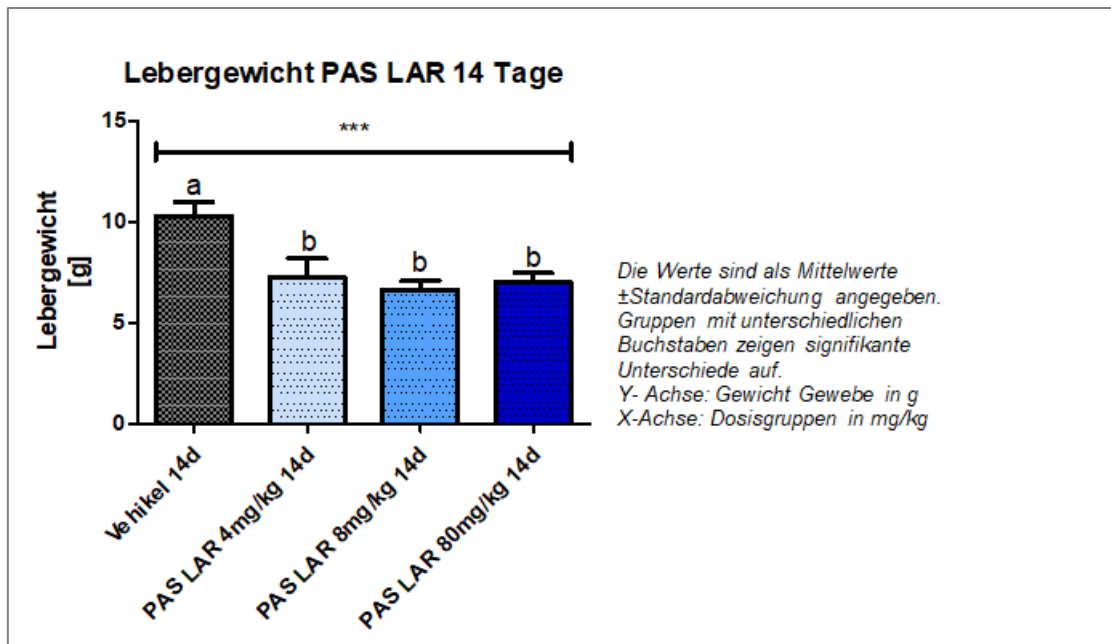


Abbildung 30: Lebergewichte 14d nach PAS LAR Injektion.

Die Gewichte der perirenal Fettdepots waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Die einzelnen Behandlungsgruppen wogen $0,9 \pm 0,1$ g (Vehikel), $0,9 \pm 0,2$ g (4mg/kg), $0,8 \pm 0,1$ g (8mg/kg) und $0,9 \pm 0,2$ g (80mg/kg).

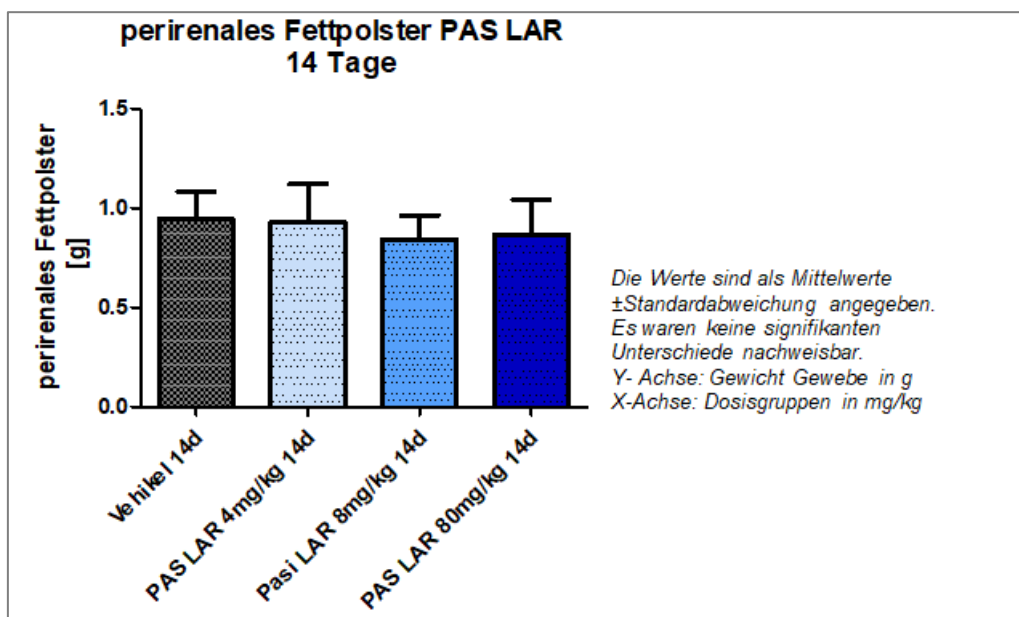


Abbildung 31: perirenale Fettdepots 14d nach PAS LAR Injektion.

Die Gewichte der epididymalen Fettpolster unterschieden sich statistisch signifikant ($p < 0,0030$), allerdings nur im Vergleich von Dosisgruppen mit der Vehikelgruppe. Die Dosisgruppen zeigten untereinander kaum Unterschiede auf (siehe Abb.32). Die Versuchstiere der Vehikelgruppe zeigten im Vergleich ein höheres Gewicht von $1,0 \pm 0,2$ g, wohingegen die Gruppen, welche das Medikament in drei verschiedenen Dosen erhalten hatten, $0,8 \pm 0,1$ g (4mg/kg), $0,8 \pm 0,8$ (8mg/kg), $0,8 \pm 0,09$ g (80mg/kg) wogen.

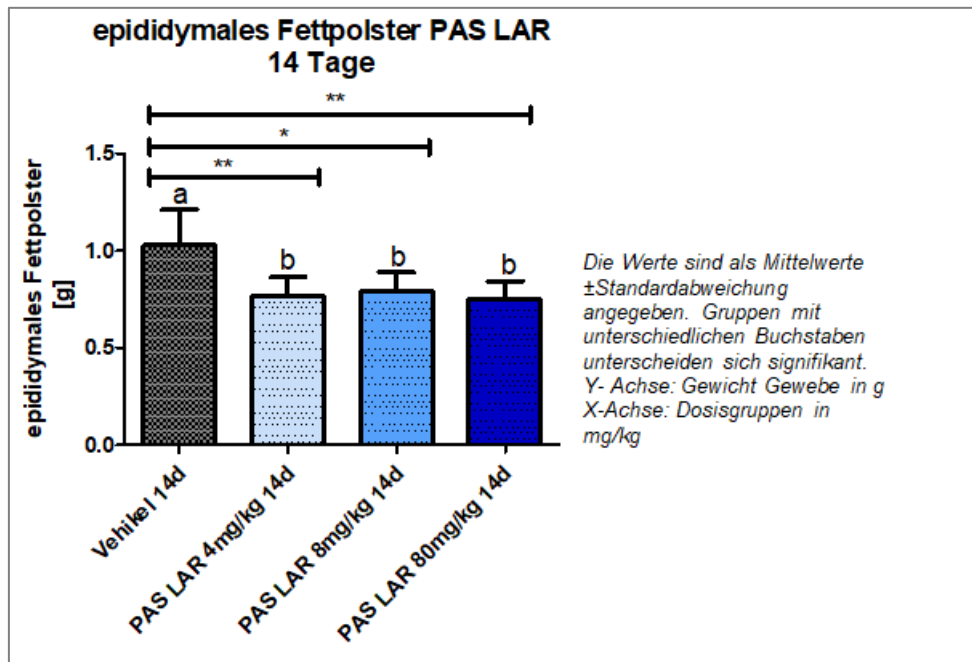


Abbildung 32: epididymale Fettdepots 14d nach PAS LAR Injektion.

3.1.3.2 Octreotid-LAR

Alle Behandlungsgruppen nahmen über die 14 Tage an Körpergewicht zu.

In Abbildung 33 ist zu sehen, dass die Versuchstiere, welche 80mg/kg Pasireotid-LAR erhalten hatten, verglichen mit den Tieren der Vehikelgruppe, signifikant ($p < 0,0309$) schwerer waren nach den 14 Tagen. Sie wogen am 14. Tag $290,0 \pm 18,2$ g (Vehikelgruppe $267,5 \pm 5,4$ g). Allerdings waren die Tiere der 80mg/kg - Gruppe schon vor Versuchsbeginn im Vergleich zur Vehikelgruppe signifikant ($p = 0,0130$) schwerer, sodass davon auszugehen ist, dass die Signifikanz nicht mit der Behandlung in Zusammenhang steht. Zur Vollständigkeit halber ist sie trotzdem aufgeführt.

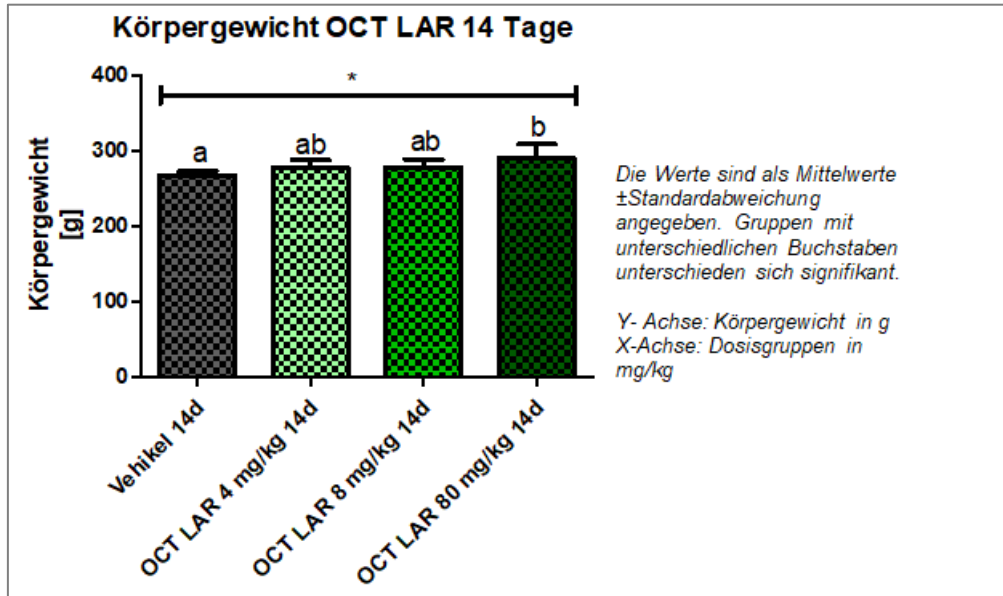


Abbildung 33: Körpergewicht 14d nach PAS LAR Injektion.

Abbildung 34 zeigt die in Abbildung 33 am Endpunkte dargestellte Gewichtsveränderung nochmals im Verlauf der zweiwöchigen Behandlungsdauer.

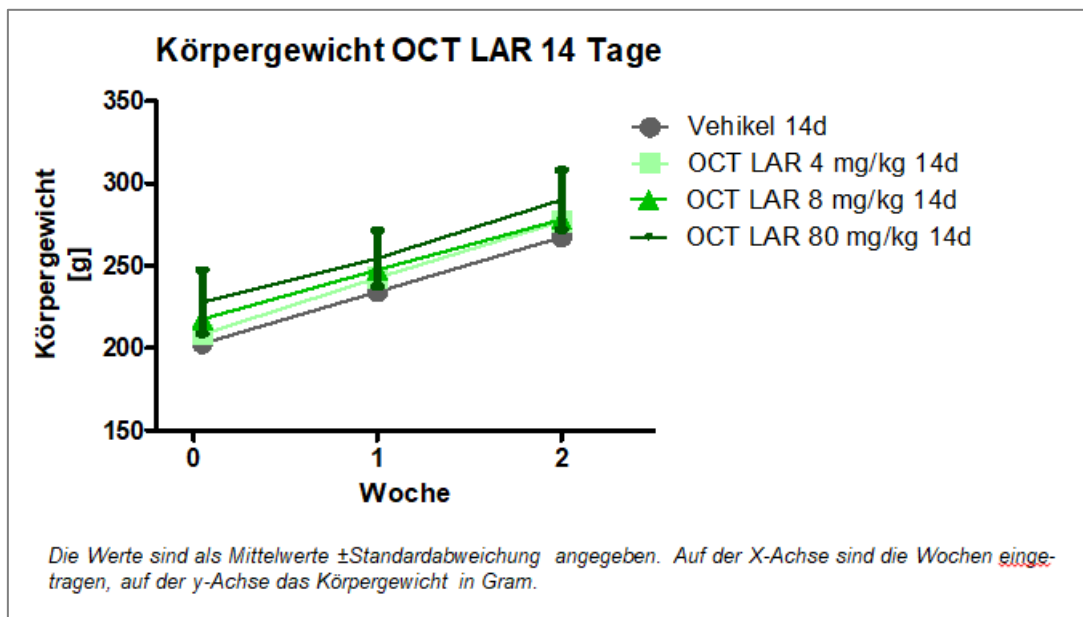


Abbildung 34: Körpergewicht Zunahme über 14d nach OCT LAR Injektion.

Das durchschnittliche Gewicht der Leber war in allen Gruppen vergleichbar. Die geringsten Lebergewichte wurden in der Vehikelgruppe ($9,4 \pm 0,6$ g), die höchsten Lebergewichte in der 80mg/kg Gruppe ($10,3 \pm 0,8$ g) detektiert. Signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen ließen sich allerdings nicht nachweisen ($p=0,2119$).

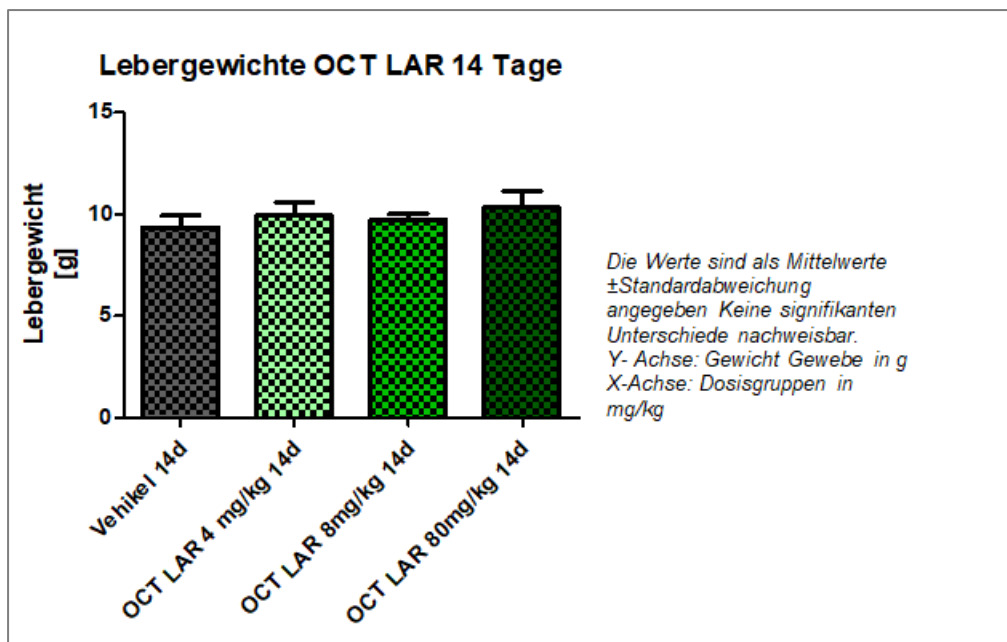


Abbildung 35: Lebergewichte 14d nach PAS LAR Injektion.

Der Vergleich der Gewichte der perirenal Fettpolster ergab keine signifikanten Unterschiede ($p=0,3186$). Die Standardabweichung der 80mg/kg Behandlungsgruppe (vgl. Abb.36) fiel größer aus, da es in dieser Gruppe zwei Ausreißer gab. Das Fettpolster des einen Tieres wog nur 0,618g, das des anderen dagegen 1,367g. Die Mittelwerte der perirenal Fettpolstergewichte dieser Tiere betrugen $0,8 \pm 0,1$ g (Vehikel), das der anderen Gruppen $0,8 \pm 0,1$ g (4mg/kg), $0,7 \pm 0,1$ g (8mg/kg) und $0,9 \pm 0,3$ g (80mg/kg).

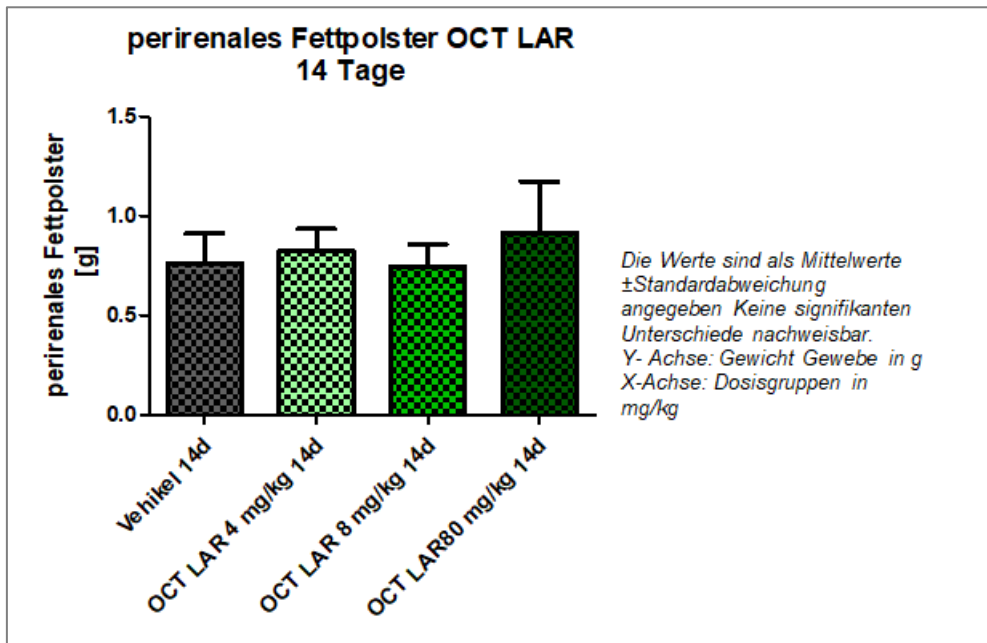


Abbildung 36: perirenale Fettdepots 14d nach PAS LAR Injektion.

14 Tage nach Injektion von Octreotid LAR waren die Durchschnittsgewichte der epididymalen Fettdepots aller Versuchstiere vergleichbar (Abb.37).

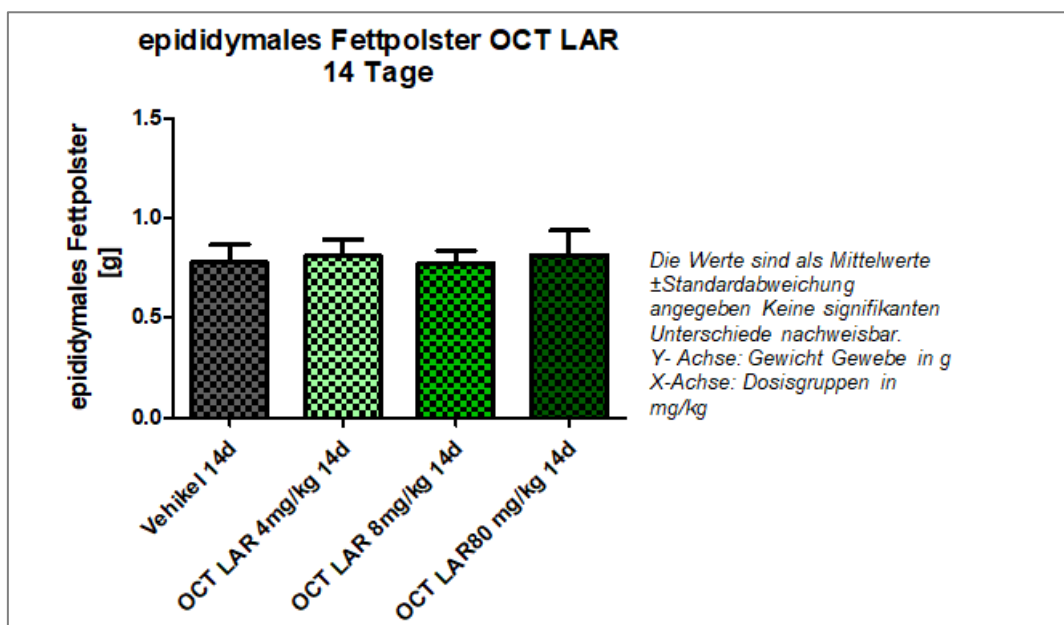


Abbildung 37: epididymales Fettdepots 14d nach PAS LAR Injektion.

3.2 Glukose

In den folgenden Graphiken sind jeweils die Blutglukosekonzentrationen der ersten Blutentnahme aus den Serienabnahmen dargestellt.

3.2.1 Short acting Somatostatin Analoga nach einmaliger und mehrmaliger Injektion

3.2.1.1 Pasireotid

Während sich die Werte der im Vollblut gemessenen Glukose der Behandlungsgruppen nach einmaliger Injektion nicht signifikant von den Gruppen mit zehnmaliger Injektion unterscheiden, bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Vehikelgruppe (10 Injektionen) und den Versuchstieren, welche zehnmal 80mg/kg Pasireotid erhalten hatten ($p=0,0045$). Wie in Abbildung 38 zu sehen, stieg die gemessene Blutglukose mit zunehmender Dosis an Pasireotid an.

Bei den Versuchstieren, die über fünf Tage Vehikel injiziert bekamen, wurde im Mittel ein Blutglukosewert von $114,5 \pm 13,8 \text{ mg/dl}$ gemessen. Die drei anderen, über fünf Tage behandelten Gruppen, zeigten signifikant ansteigende Werte von $130,5 \pm 9,9 \text{ mg/dl}$ ($10 \mu\text{g/kg}$), auf $137,7 \pm 15,8 \text{ mg/dl}$ ($30 \mu\text{g/kg}$) und $156,7 \pm 25,0 \text{ mg/dl}$ ($50 \mu\text{g/kg}$).

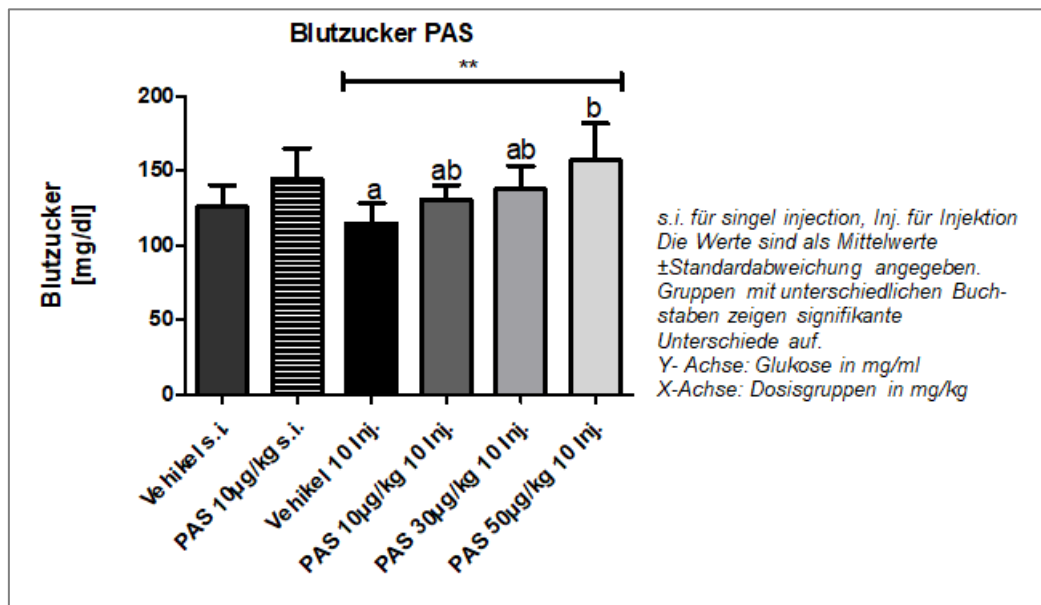


Abbildung 38: Glukose im Vollblut nach ein,- oder zehnmaliger Injektion von Pasireotid.

3.2.1.2 Octreotid

In dem Teilexperiment, in welchem Octreotid einmalig oder konsekutiv über fünf Tage gespritzt worden war, war ein statistisch signifikanter Unterschied der Blutglukosekonzentration zwischen der Vehikelgruppe ($101,6 \pm 6,5 \text{ mg/dl}$) und der $10 \mu\text{g/kg}$ -Gruppe ($89,5 \pm 7,4 \text{ mg/dl}$) nach jeweils zehn Injektionen nachweisbar ($p=0,0331$).

Die beiden anderen Behandlungsgruppen, die jeweils 10 Injektionen erhalten hatten, zeigten höhere Werte im Vergleich zu der $10 \mu\text{g/kg}$ Gruppe auf: $92,3 \pm 4,40 \text{ mg/dl}$ ($30 \mu\text{g/kg}$) und $93,40 \pm 8,2 \text{ mg/dl}$ nach zehnmaliger Injektion von $50 \mu\text{g/kg}$.

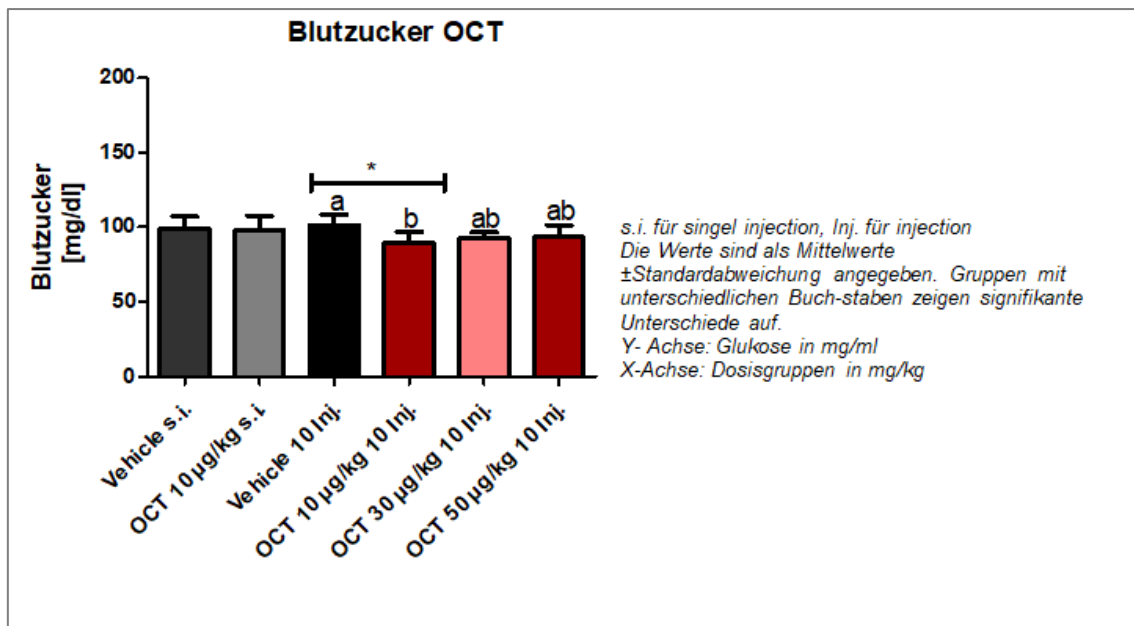


Abbildung 39: Glukose im Vollblut nach ein,- oder zehnmaliger Injektion von Octreotid.

3.2.2 Long-acting Somatostatin Analoga (LAR) 24 Stunden nach Injektion

3.2.2.1 Pasireotid-LAR und Pasireotid-LAR niedrige Dosis

24 Stunden nach Injektion des Vehikels beziehungsweise von 4, 8 oder 80 mg/kg Pasireotid-LAR ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,0372$) zwischen der Vehikelgruppe ($123,7 \pm 8,6 \text{ mg/dl}$) und den Tieren, welche 80 mg/kg ($146,8 \pm 13,2 \text{ mg/dl}$) injiziert bekommen hatten.

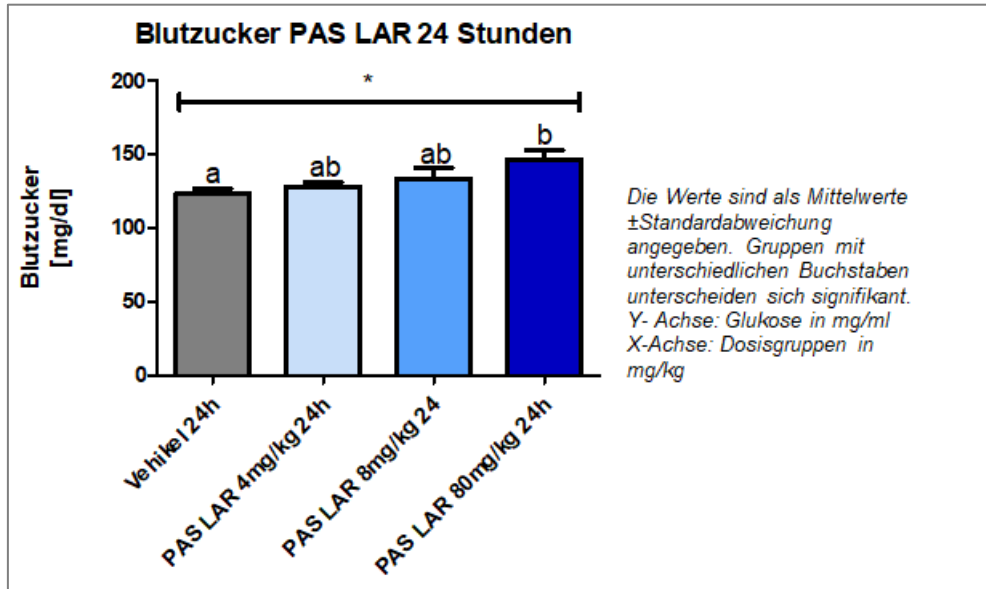


Abbildung 40: Glukose im Vollblut 24 Stunden nach PAS-LAR Injektion.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede (Abb.41) innerhalb der Behandlungsgruppen, welche niedrigere Dosen an Pasireotid- LAR erhalten hatten. Bei den Versuchstieren der Vehikelgruppe wurden signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Glukosekonzentrationen gemessen, als bei der 0,5mg/kg und 1,0mg/kg Behandlungsgruppe: $93,6 \pm 6,7$ mg/dl (Vehikel), $101,8 \pm 5,6$ mg/dl (0,1mg/kg), $105,0 \pm 5,3$ mg/dl (0,5mg/kg), $106,7 \pm 5,8$ mg/dl (1,0mg/kg).

Bei Tier sechs aus der 80mg/kg- Gruppe war kein Wert messbar.

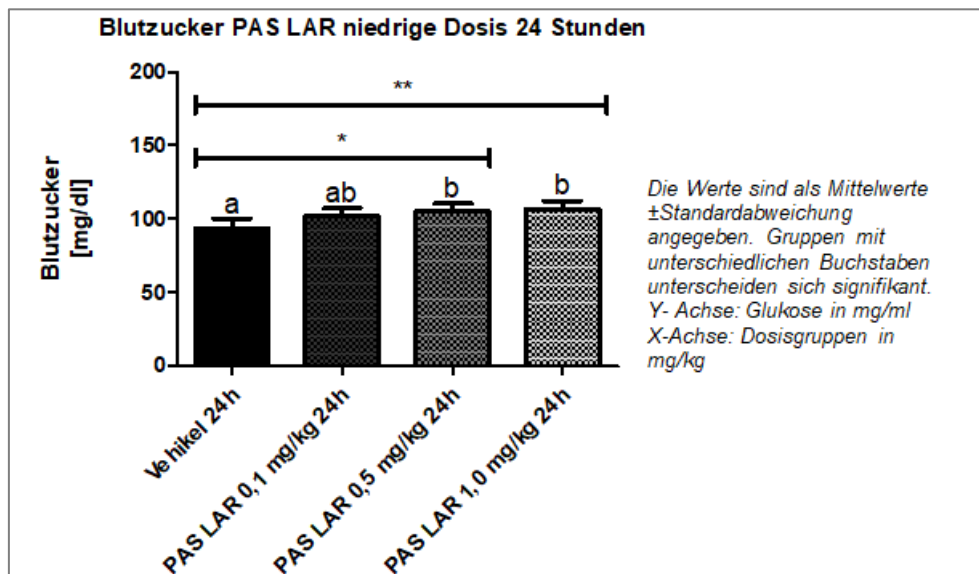


Abbildung 41: Glukose im Vollblut 24 Stunden nach PAS-LAR niedrige Dosis Injektion.

3.2.2.2 Octreotid-LAR

Die Werte der im Vollblut gemessenen Glukose zeigten 24 Stunden nach Injektion von Octreotid-LAR keine signifikanten Unterschiede ($p>0,05$). Die Versuchstiere der unterschiedlichen Dosisgruppen hatten vergleichbare Konzentrationen an Glukose im Blut, nur die Tiere der 80mg/kg Gruppe lagen minimal niedriger (Abb.42).

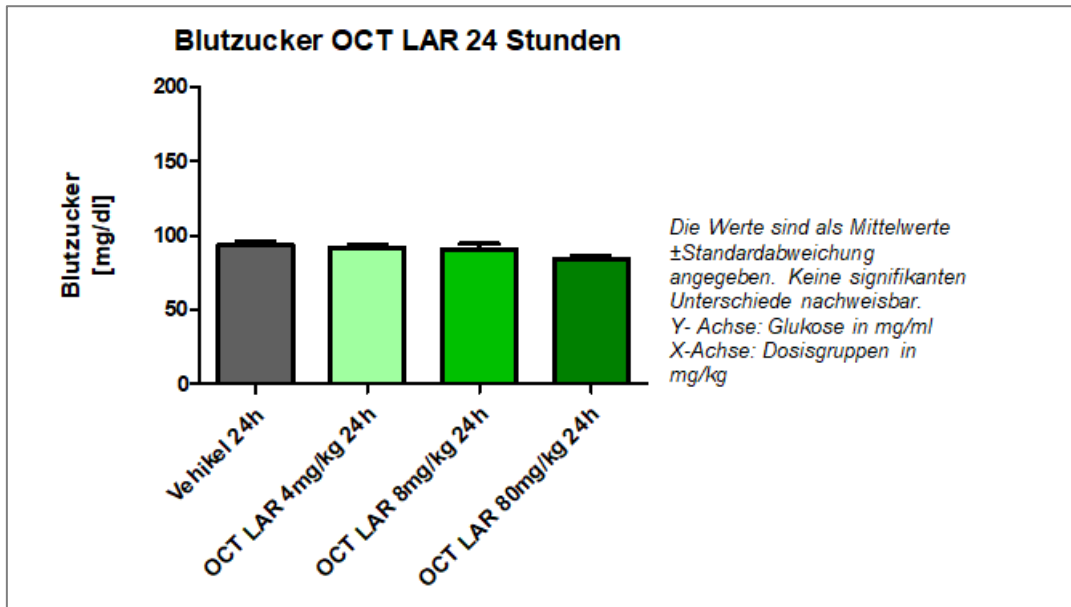


Abbildung 42: Glukose im Vollblut 24 Stunden nach OCT-LAR Injektion.

3.2.3 Long-acting Somatostatin Analoga (LAR) 14 Tage nach Injektion

3.2.3.1 Pasireotid-LAR

Die Versuchstiere der Pasireotid-LAR Behandlungsgruppen (Abb.43) zeigten nach 14 Tagen statistisch signifikante Unterschiede in der im Vollblut gemessenen Glukosekonzentration ($p=0,0023$) auf. Die Tiere der 8mg/kg-Gruppe hatten im Blut eine durchschnittliche Glukosekonzentration von $131,8 \pm 10,8$ mg/dl, während im Blut der Vehikelgruppe nur $113,0 \pm 6,2$ mg/dl und in dem der 4mg/kg-Gruppe nur $110,7 \pm 8,2$ mg/dl gemessen wurden. Die 80mg/kg Dosisgruppe unterschied sich von keiner anderen Gruppe signifikant.

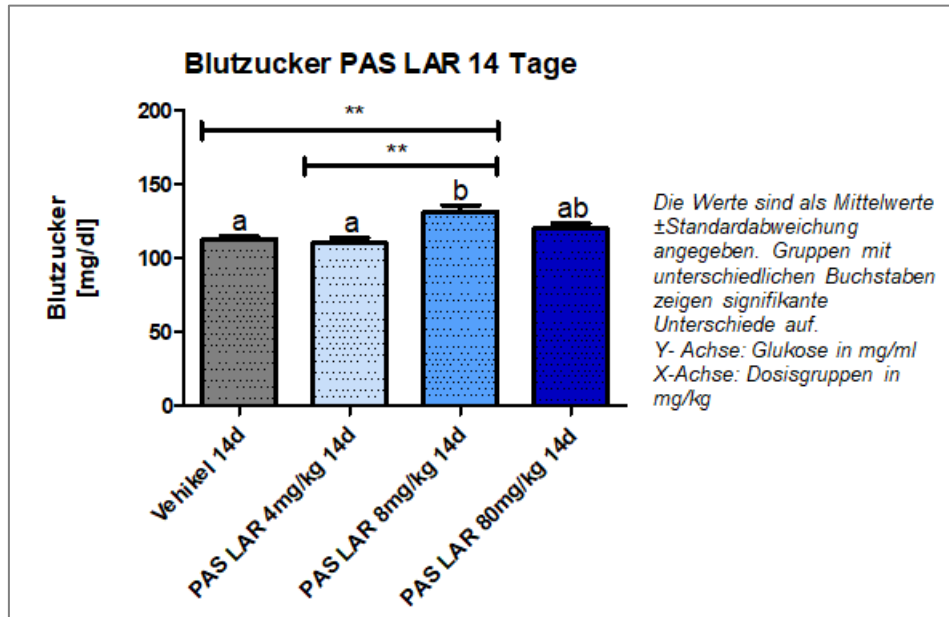


Abbildung 43: Glukose im Vollblut 14 Tage nach PAS-LAR Injektion.

3.2.3.2 Octreotid-LAR

14 Tage nach Injektion von Octreotid-LAR waren signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Behandlungsgruppen nachweisbar. Hierbei unterschied sich die Glukosekonzentration der 8mg/kg- Gruppe signifikant von der der Vehikelgruppe, sowie von der 80mg/kg- Dosisgruppe ($p < 0,05$). Mit einem Mittelwert von $89,5 \pm 5,3$ mg/dl lag die 8mg/kg- Gruppe unterhalb der gemessenen Werte der Vehikelgruppe ($101,7 \pm 5,3$ mg/dl) und der 80mg/kg-Gruppe ($99,5 \pm 1,7$).

Die Blutglukose war bei Tier eins der 80mg/kg- Gruppe nicht messbar.

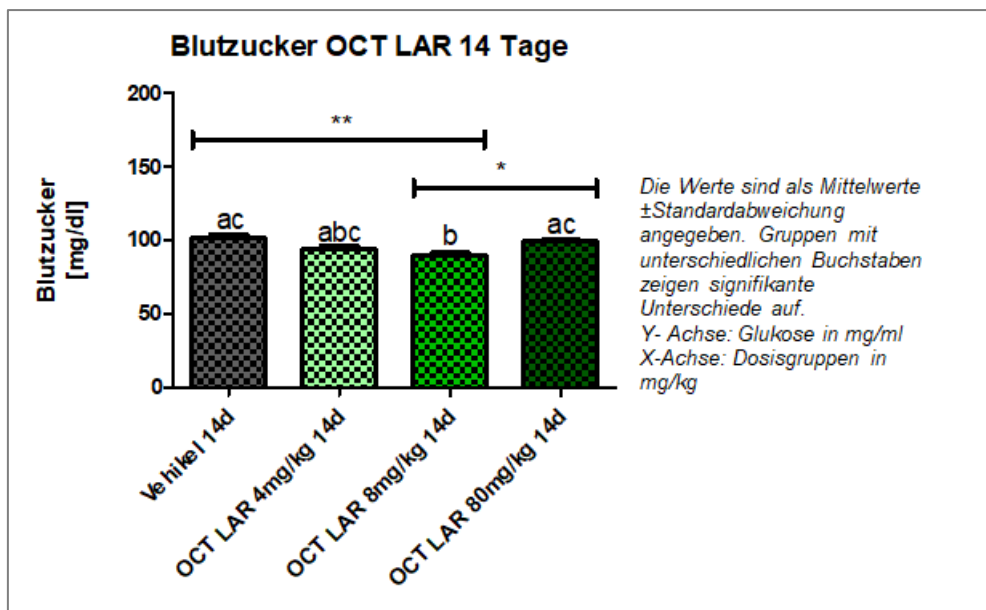


Abbildung 44: Glukose im Vollblut 14 Tage nach OCT-LAR Injektion.

3.3 IGF- I und Wachstumshormon

3.3.1 Short acting Somatostatin Analoga nach einmaliger und mehrmaliger Injektion

3.3.1.1 Pasireotid

A, IGF- I

IGF- I wurde in Serumproben aus der 10. Blutabnahme gemessen. Nach ein-, beziehungsweise zehnmaler Injektion zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der 50 $\mu\text{g/kg}$ -Gruppe und dem Vehikel 10inj. (siehe Abb. 45). Die Versuchstiere der 50 $\mu\text{g/kg}$ -Gruppe zeigten mit $846,3 \pm 102,1 \text{ ng/ml}$ die niedrigste IGF- I Konzentration im Blut auf. Im Vergleich dazu wurde bei der Vehikelgruppe nach zehnmaler Injektion ein Wert von $1126 \pm 92,7 \text{ ng/ml}$ gemessen.

Die IGF- I Werte der 10 und 30 $\mu\text{g/kg}$ -Gruppen lagen dazwischen.

Sowohl in der Vehikel s.i, als auch in der 10 $\mu\text{g/kg}$ s.i.- Gruppe waren bei Tier fünf und sechs keine Werte messbar.

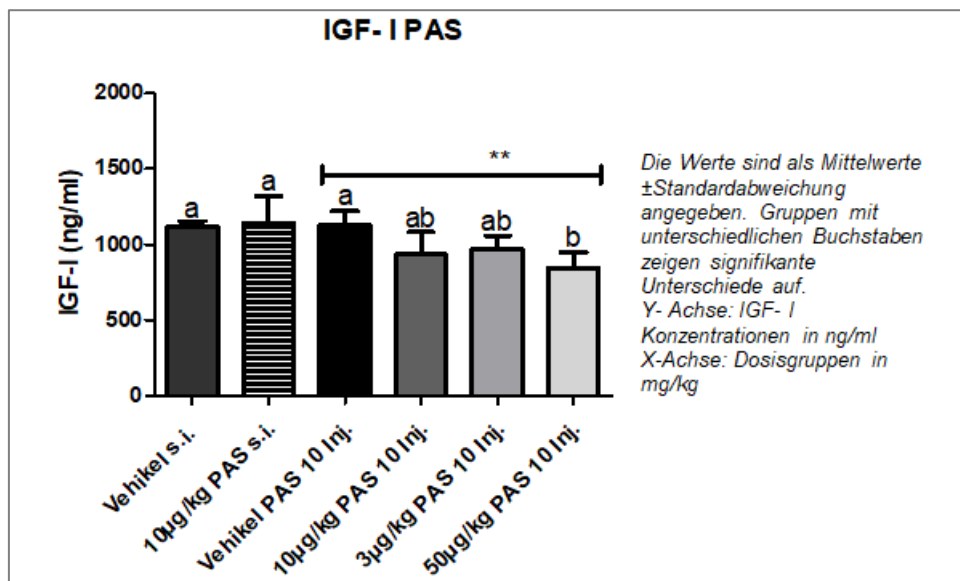


Abbildung 45: IGF- I nach ein-, und zehnmaler PAS Injektion.

Die nachstehende Tabelle (Tab.11) gibt einen Überblick über die Suppression des IGF- I in Bezug zur Vehikelgruppe. Der Durchschnittswert der Tiere, welche Vehikel erhielten, wurde mit 100% angegeben und die anderen Durchschnittswerte wurden zu diesem Wert jeweils in Bezug gesetzt. Daraus ergibt sich zum Beispiel, dass die Tiere, welche zweimal pro Tag 50 $\mu\text{g/kg}$ über fünf Tage erhielten, mit einem Durchschnittswert von 846,3 ng/ml 24.8% unterhalb der Vehikelgruppe (1126 ng/ml) lagen.

	Vehikel	10µg/kg	30µg/kg	50µg/kg
Durchschnittswert in ng/ml ± SD	1126 ±92,72	935,7 ± 145,7	973,2 ± 86,31	846,3 ± 102,1
Wert in % mit Vehikel als 100%		83	86,4	75,2
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		17	13,6	24,8

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml angegeben ± die jeweilige SD. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des IGF- I in dieser Dosisgruppe statt.

Tabelle 11: Suppression IGF- I nach PAS Injektion.

B, Wachstumshormon

Die Konzentration des Wachstumshormons wurde bei jedem Versuchstier in zehn Proben aus aufeinander folgenden Blutabnahmen gemessen. Um die dadurch entstehenden Profile vergleichen zu können, wurden rank plots angelegt (vergleiche Abb. 47) und die AUC wurde pro Gruppe berechnet. In Abbildung 47 ist graphisch die Suppression des Wachstumshormons abhängig von der jeweiligen Behandlung dargestellt. Die AUC entspricht der Fläche unterhalb des Graphen und spiegelt die Blutkonzentrationen des GH der jeweiligen Versuchstiergruppe wider.

Die Analyse der beiden single injection Gruppen zeigte keinen statistischen Unterschied.

Bei den Dosisgruppen, welche zehn Injektionen bekamen, zeigten sich folgende Unterschiede: Die AUC der 10µg/kg Gruppe und Vehikelgruppe unterschieden sich signifikant ($p=0,005$). Außerdem lagen bei der Vehikelgruppe 42% der gemessenen GH- Werte unter 1ng/ml, nach zehn Injektionen von 10µg/kg waren es 83% (vergleiche Abb.46).

Sowohl von der 30 µg/kg- Gruppe, als auch von der 50 µg/kg- Gruppe wurde jeweils ein Ausreißer (22,58 ng/ml und 72,75 ng/ml) von der statistischen Analyse ausgeschlossen.

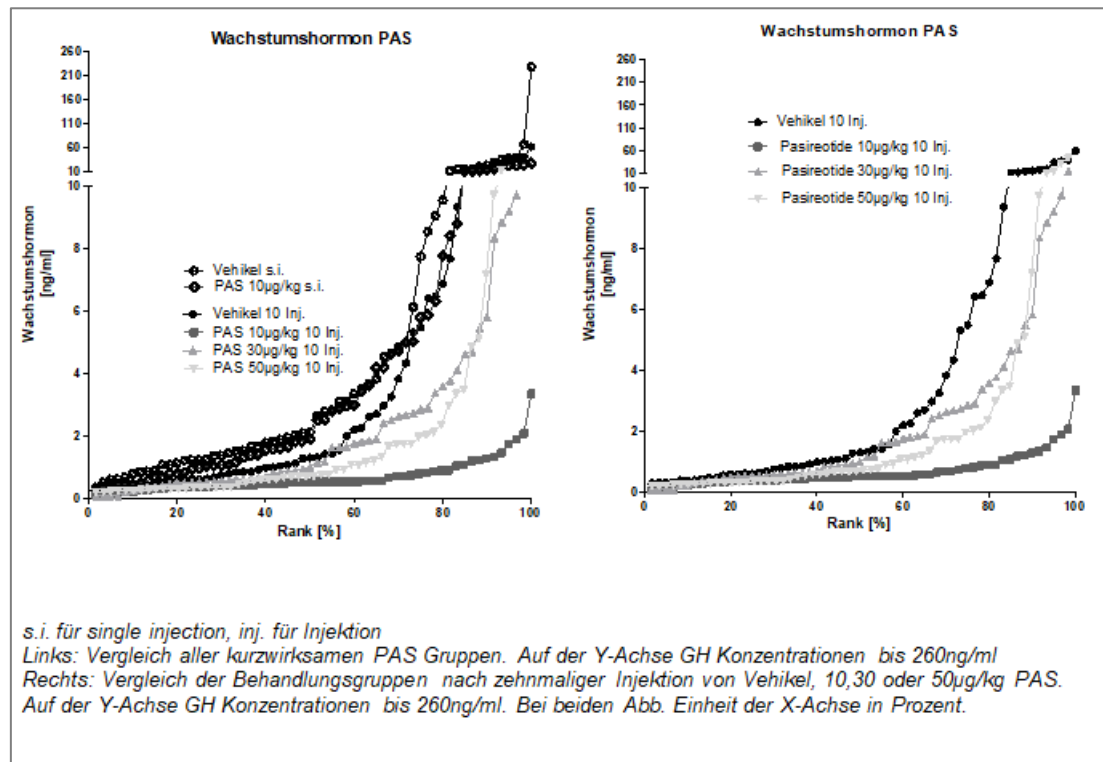


Abbildung 46: Wachstumshormonkonzentrationen nach ein-, und zehnmaliger PAS Injektion.

In Tabelle 12 ist die in der Abbildung 46 graphisch dargestellte Suppression in Prozent wiedergegeben. Während nach zehnmaliger Injektion von 10µg/kg eine Reduktion des Durchschnittswertes um 89,2% erreicht werden konnte, waren es bei 50µg/kg nur 51,6%.

	Vehikel	10µg/kg	30µg/kg	50µg/kg
Durchschnittswert in ng/ml ± SD	6,2 ± 11,47	0,67 ± 0,56	2,3 ± 2,95	3,0 ± 7,34
Wert in % mit Vehikel als 100%		10,8	37,1	48,4
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		89,2	62,9	51,6

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml mit jeweiliger SD angegeben. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des GH in dieser Dosisgruppe statt.

Tabelle 12: Suppression GH nach PAS Injektion.

3.3.1.2 Octreotid

A, IGF- I

Die IGF- I Werte im Serum der Tiere der unterschiedlichen Octreotid- Behandlungsgruppen wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 47) auf. Die Tiere aller vier Behandlungsgruppen, welche 10 Injektionen verschiedener Dosen erhalten hatten, zeigten insgesamt niedrigere IGF- I Konzentrationen im Vergleich zu den single injection Gruppen.

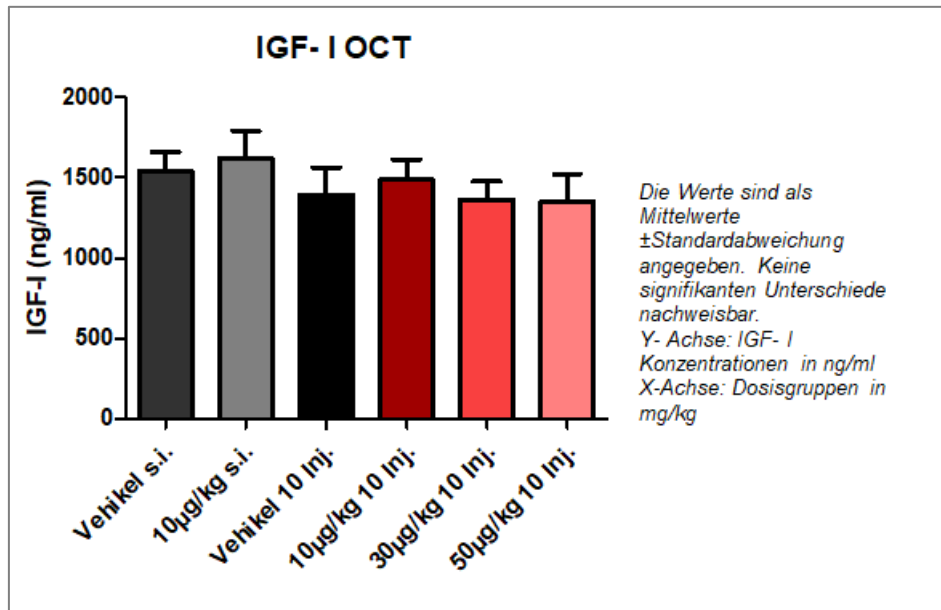


Abbildung 47: IGF- I nach ein-, und zehnmaliger OCT Injektion.

Die IGF- I Konzentrationen aller Dosisgruppen waren am fünften Tag nach zehnmaliger Injektion verschiedenener Dosen kaum erniedrigt (vergleiche Tabelle 13). Die maximale Suppression betrug 3,1% unter 50 µg/kg.

	Vehikel	10µg/kg	30µg/kg	50µg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	1392 \pm 169,8	1488 \pm 127,1	1365 \pm 110,4	1350 \pm 173,6
Wert in % mit Vehikel als 100%		106,9	98	96,9
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %			2	3.1

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm die jeweilige SD angegeben. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des IGF- I in dieser Dosisgruppe statt.

Tabelle 13: Suppression IGF- I nach OCT Injektion.

B, Wachstumshormon

Der Vergleich der rank plots und die Berechnung der AUC zeigten keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Suppression des GH.

Als Ausreißer wurden folgende Werte in der Berechnung nicht berücksichtigt:

142,66ng/ml (Vehikelgruppe), 97,84ng/ml (10µg/kg- Gruppe), 236,74ng/ml (30µg/kg- Gruppe) und 62,90 ng/ml aus der 50µg/kg- Gruppe.

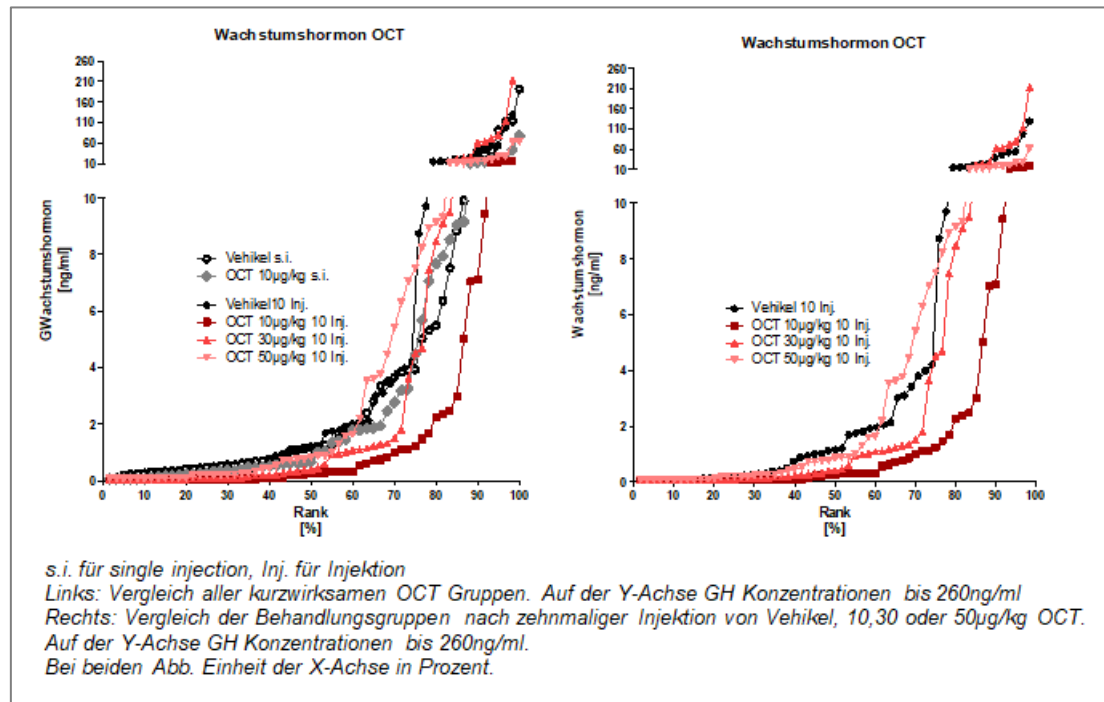


Abbildung 48: Wachstumshormonkonzentrationen nach ein-, und zehnmaliger OCT Injektion.

Errechnet man aus allen GH- Einzelwerten den Gruppen- Mittelwert (oben genannte Ausreißer wurden berücksichtigt) und setzt ihn in Relation zum Mittelwert der Vehikelgruppe (10,44 ng/ml), so wird deutlich, dass vor allem die Behandlung mit 10µg/kg zu einer ausgeprägten Suppression führte (um 81,5%) und 50µg/kg etwas schwächer wirksam war (Tabelle 14). Der Eindruck eines Anstieges bei Betrachtung der Werte in der 30µg/kg Dosisgruppe beruhte vor allem auf drei sehr hohen Einzelwerten. Würden diese 3 hohen Werte aus der Analyse exkludiert werden, würde man ebenfalls eine Suppression sehen.

	Vehikel	10µg/kg	30µg/kg	50µg/kg
Durchschnittswert in ng/ml ±SD	10,44 ± 23,75	1,935 ± 4,018	12,52 ± 34,86	5,207 ± 9,844
Wert in % mit Vehikel als 100%		18,5	119,9	49,9
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		81,5		50,1

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml ± die jeweilige SD angegeben. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des GH in dieser Dosisgruppe statt. In die Berechnung dieser Werte flossen die Ausreißer mit ein.

Tabelle 14: Suppression GH nach OCT Injektion.

3.3.2 Long acting Somatostatin Analoga (LAR) 24 Stunden nach Injektion

3.3.2.1 Pasireotid-LAR und Pasireotid-LAR niedrige Dosis

A, IGF- I

24 Stunden nach Injektion des langwirksamen Pasireotids 4, 8 und 80mg/kg (Abb. 49) waren die gemessenen IGF- I Werte aller Behandlungsgruppen gegenüber der Vehikelgruppe signifikant niedriger ($p < 0,0001$). Die Tiere der Vehikelgruppe wiesen im Mittel einen IGF- I Wert von 1168ng/ml auf, die Ratten der Dosisgruppen hingegen Werte von 368,2 ng/ml (4mg/kg), 392,0 ng/ml (8mg/kg) und 413,0 ng/ml (80mg/kg).

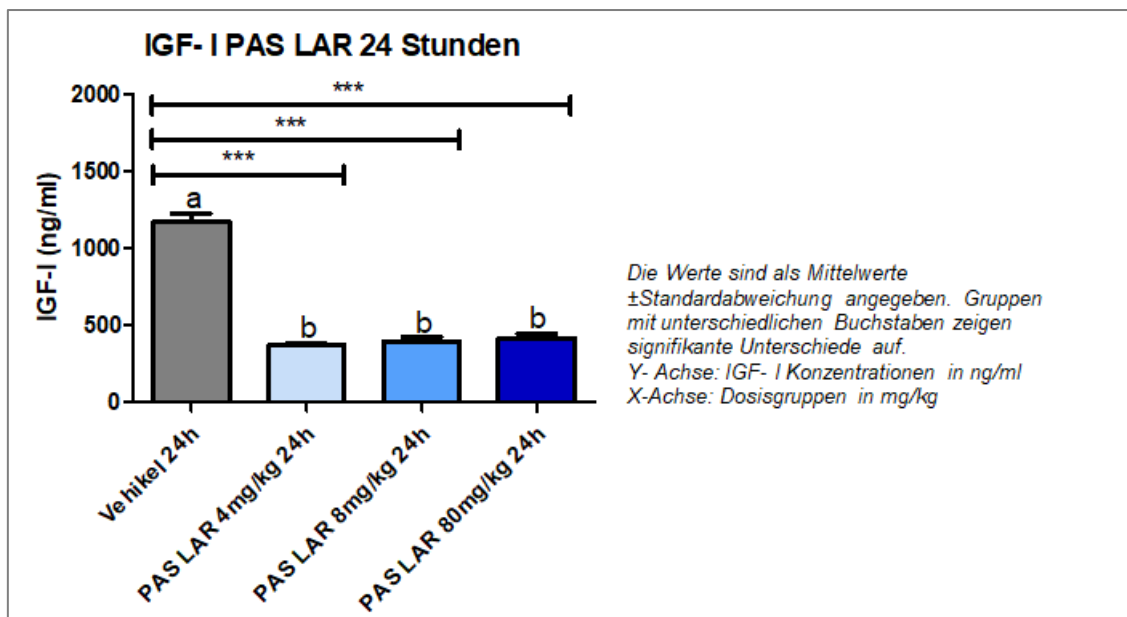


Abbildung 49: IGF- I 24h nach PAS LAR Injektion.

Die reziproke, dosisabhängige Suppression des IGF- I 24 Stunden nach Injektion ist in Tabelle 15 nochmals dargestellt. Mit höherer Dosis nahm die Suppression ab: Der Durchschnittswert nach 4mg/kg lag bei 31,5%, nach 80mg/kg stieg er auf 35,3% des Referenzwertes (100%= 1168ng/ml, Vehikel) an. Dies entsprach einer Suppression von 68,5, beziehungsweise 64,7% (vergleiche Tabelle 14).

	Vehikel	4mg/kg	8mg/kg	80mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	1168 \pm 137,5	368,2 \pm 33,63	392,0 \pm 67,18	413,0 \pm 73,29
Wert in % mit Vehikel als 100%		31,5	33,5	35,3
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		68,5	66,5	64,7

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm die jeweilige SD angegeben. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des IGF- I in dieser Dosisgruppe statt.

Tabelle 15: Suppression IGF- I 24h nach PAS LAR Injektion.

Auch die niedrigeren Dosen an PAS LAR (0,1, 0,5 und 1,0mg/kg) wiesen signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) auf (Abb. 50).

Der IGF- I- Mittelwert der Vehikelgruppe (1371ng/ml) unterschied sich signifikant von der gemessenen Konzentration im Serum der 1,0mg/kg- Gruppe (961,3ng/ml).

Die Versuchstiere, welche 0,1mg/kg Pasireotid LAR injiziert bekommen hatten, zeigten eine höhere, nicht signifikant unterschiedliche IGF- I Konzentration im Serum (1554ng/ml) verglichen mit der Vehikelgruppe (1371ng/ml). Die IGF- I Konzentration im Serum der Versuchstiere der 0,1mg/kg- Gruppe (1554ng/ml) unterschied sich signifikant von der 0,5mg/kg- Gruppe (1092ng/mg) und der 1,0mg/kg- Gruppe (961,3ng/mg).

Tier fünf der 1,0mg/kg- Gruppe musste als Ausreißer aus der statistischen Analyse genommen werden (IGF- I = 1681,520ng/ml).

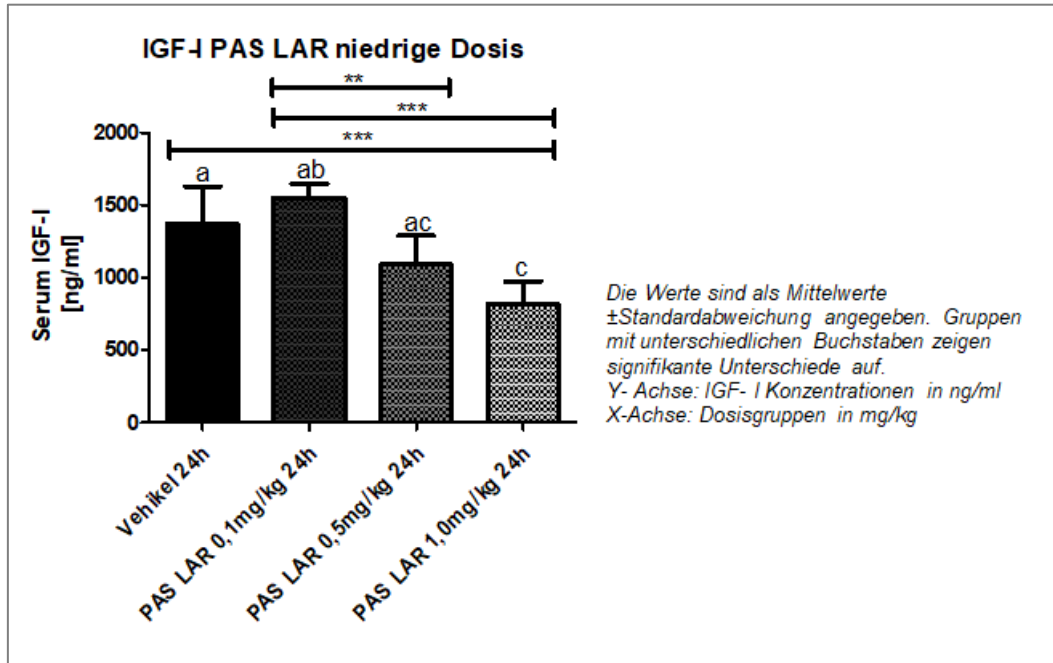


Abbildung 50: IGF- I 24h nach PAS LAR niedrige Dosis Injektion.

Wie bereits beschrieben, stieg IGF- I nach 0,1mg/kg PAS LAR Gabe auf 113,3% des Mittelwertes der Vehikelgruppe an (vergleiche Tabelle 15). 0,5mg/kg und 1,0mg/kg führten zu einer Erniedrigung der IGF- I Werte um 20,4 und 40,4% des Vehikelwertes (1371ng/ml).

	Vehikel	0,1mg/kg	0,5mg/kg	1,0mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	1371 \pm 260,3	1554 \pm 97,43	1092 \pm 198,4	817,3 \pm 157,5
Wert in % mit Vehikel als 100%		113,3	79,6	59,6
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %			20,4	40,4

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm die jeweilige SD angegeben. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des IGF- I in dieser Dosisgruppe statt.

Tabelle 16: Suppression IGF- I 24h nach PAS LAR niedrige Dosis Injektion.

B, Wachstumshormon

24 Stunden nach der Gabe von PAS LAR waren die Wachstumshormonkonzentrationen der drei Dosisgruppen (4, 8, 80mg/kg) supprimiert im Vergleich zu der Vehikelgruppe. Die AUC der Dosisgruppen unterschieden sich signifikant ($p = 0,0001$) (Abb.51) von der Vehikel- AUC.

Zudem lagen alle gemessenen Werte der 4,8, und 80mg/kg Gruppen unterhalb der 1ng/ml Grenze.

Anders verhielt es sich nach Injektion der niedrigen Dosen PAS LAR (Abb. 55). Sowohl die Tiere, welche 1,0mg/kg, als auch jene, die 0,5mg/kg einmalig injiziert bekommen hatten, zeigten signifikant niedrigere GH- Spiegel als die 0,1mg/kg Versuchsgruppe ($p= 0,0027$). Nur 43% der gemessenen GH- Werte der Tiere, die 0,1mg/kg erhalten hatten, lagen unter 1ng/ml, während es in der 0,5mg/kg- Gruppe 68% und in der 1,0mg/kg –Gruppe circa 86% waren.

Die Vehikelgruppe unterschied sich von keiner der Dosisgruppen signifikant.

In den Boxplot- Diagrammen (Abb. 52) ist die Verteilung der gemessenen GH- Werte in den verschiedenen Gruppen graphisch gut abzulesen. Bei der Darstellung PAS LAR niedrige Dosen Gruppen ist zu erkennen, dass die obere Quartil der 0,5mg/kg-Gruppe mit dem Median der 0,1mg/kg- Gruppe auf derselben Höhe lag. Dies bedeutet demnach, dass 75% der gemessenen GH- Konzentrationen nach der Gabe von 0,5mg/kg sich unterhalb des Medianwertes der 0,1mg/kg- Gruppe bewegten. Dies unterstreicht die zunehmende Wirkung bei höherer Dosis.

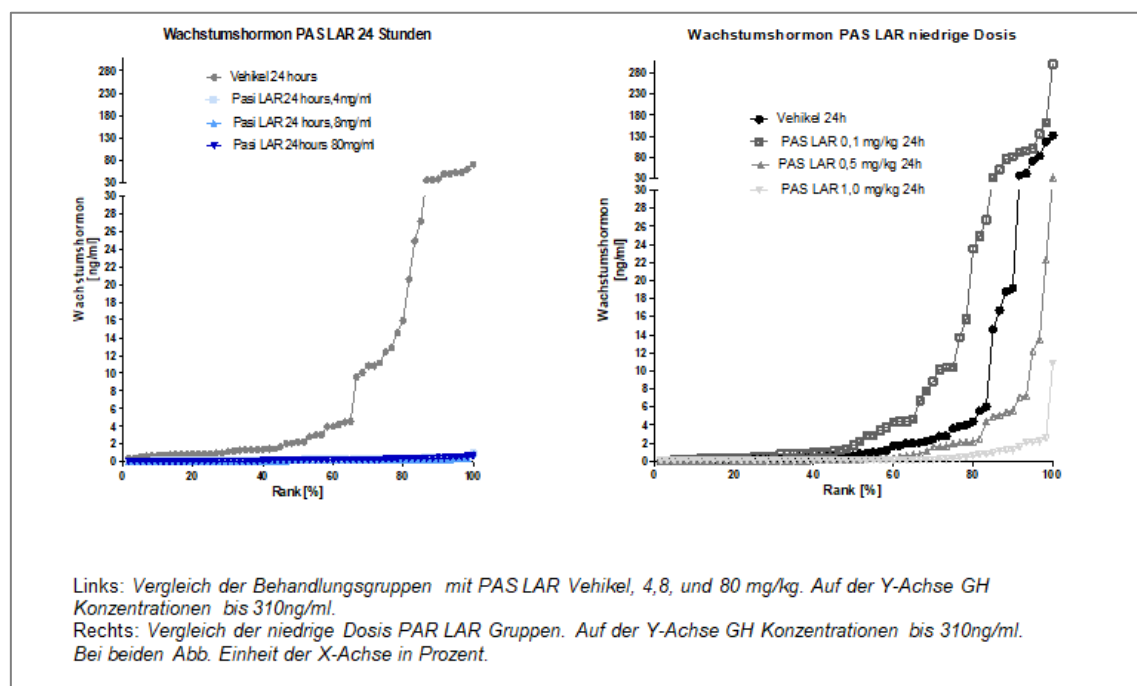


Abbildung 51: Wachstumshormonkonzentrationen 24h nach PAS LAR Injektion.

Mit einer Suppression von 97,4, 98,3 und 98,13% waren alle drei Dosen sehr effektiv (siehe Tabelle 17). 24 Stunden nach der Gabe war eine Abhängigkeit der GH- Suppression von einer Dosis nicht zu beobachten.

	Vehikel	4mg/kg	8mg/kg	80mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	11,73 \pm 18,05	0,31 \pm 0,16	0,2 \pm 0,12	0,22 \pm 0,16
Wert in % mit Vehikel als 100%		2,6	1,7	1,87
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		97,4	98,3	98,13

*In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm SD angegeben.
In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt.
In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des GH in dieser Dosisgruppe statt.*

Tabelle 17: Suppression GH 24h nach PAS LAR Injektion.

Die statistische Analyse der AUC- Werte zwischen Vehikel und Dosisgruppen war, wie oben erläutert, nicht signifikant. Vergleicht man hingegen den Durchschnitt aller Werte pro Dosisgruppe (Tabelle 18) mit dem der Vehikelgruppe, so wird die erreichte Suppression durch 1,0mg/kg mit 94,7% angegeben.

Es war bei den sehr niedrigen Dosen zudem eine gewisse Dosisabhängigkeit festzustellen, da 0,1mg/kg die GH- Spiegel erhöhten und 1,0mg/kg mit 94,7% eine sehr effektive Suppression des GH bewirkte.

	Vehikel	0,1mg/kg	0,5mg/kg	1,0mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	10.16 \pm 2633	22,22 \pm 50,67	2,39 \pm 5,46	0,54 \pm 1,48
Wert in % mit Vehikel als 100%		218,7	23,5	5,3
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %			76,5	94,7

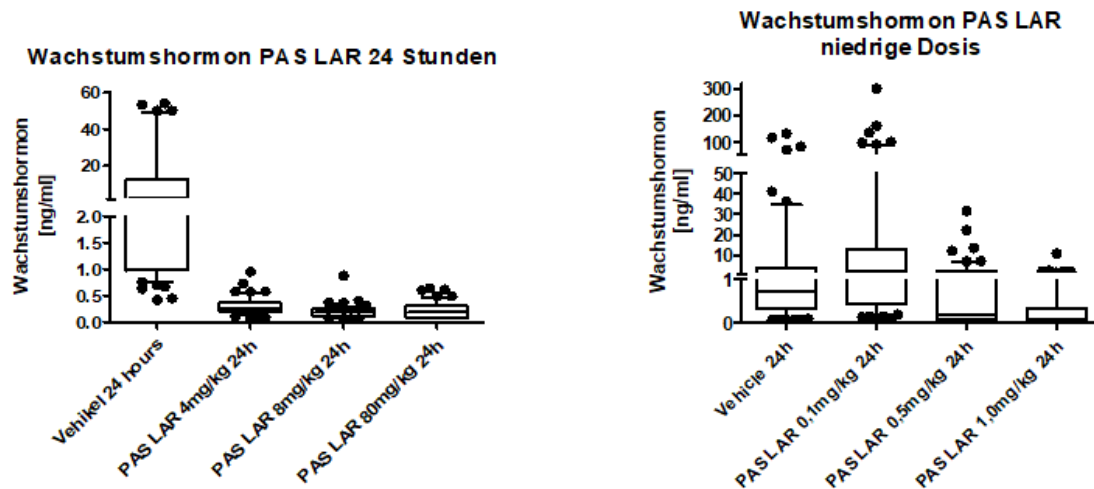
*In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm die jeweilige SD angegeben.
In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt.
In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des GH in dieser Dosisgruppe statt.*

Tabelle 18: Suppression GH 24h nach PAS LAR niedrige Dosis Injektion.

Boxplots (Box- Whisker plot):

Dargestellt durch die Box und ihre Fühler ist jeweils die 10. bis 90. Perzentile. Die schwarzen Punkte zeigen Werte außerhalb dieses Bereiches an. Der Median gibt die Mitte wieder, das heißt 50% der Werte liegen unter- und 50% oberhalb dieser Marke. Die untere Begrenzung der

Box repräsentiert das untere Quartil, 25% der Daten liegen darunter. Die obere Begrenzung der Box entspricht demnach dem oberen Quartil, 75% der Daten liegen darunter.



Dargestellt ist durch Box und Ausläufer die 10.-90. Perzentile. Der Strich innerhalb der Box gibt den Median wieder, die schwarzen Punkte stehen für Werte außerhalb der Perzentilen. Y-Achse: GH Konzentration in ng/ml; X-Achse: Dosisgruppen in mg/kg

Abbildung 52: Boxplot GH 24h nach PAS LAR Injektion.

3.3.2.2 Octreotid-LAR

A, IGF- I

Die gemessenen IGF- I Serumwerte 24 Stunden nach Injektion von Octreotid LAR (Abb.53) wiesen einen signifikanten Unterschied zwischen der Vehikel- und 80mg/kg- Gruppe auf (1345ng/ml versus 1009ng/ml) auf.

Die Durchschnittswerte nach 4 und 8mg/kg Injektion lagen mit 954,5ng/ml beziehungsweise 1138ng/ml dazwischen.

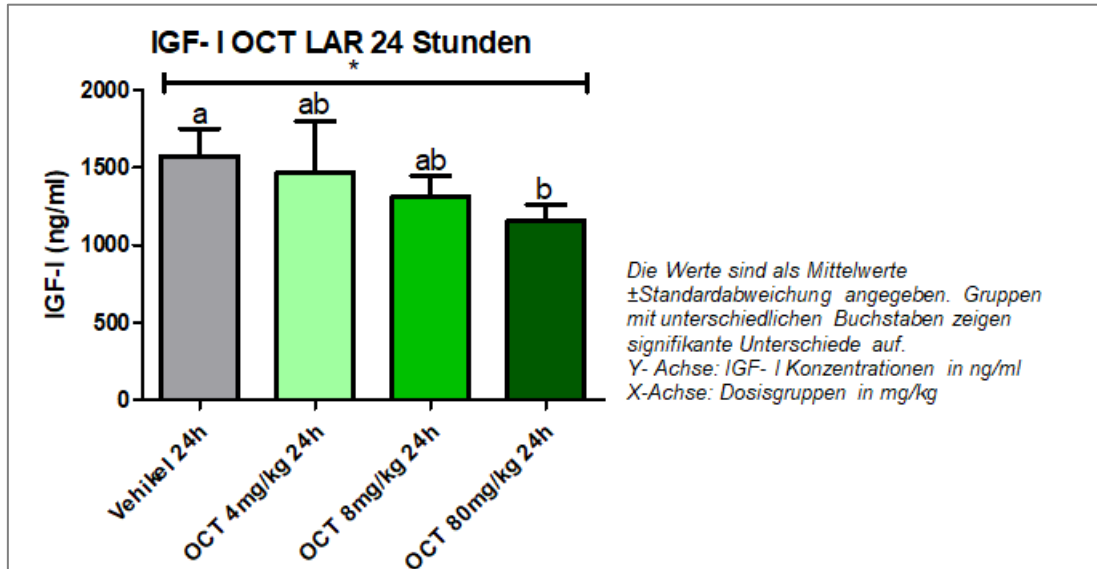


Abbildung 53: IGF- I 24h nach OCT LAR Injektion.

24 Stunden nach OCT LAR- Gabe lag die maximale Suppression bei 26,5% nach Injektion von 80mg/kg. In Tabelle 19 ist die in Abbildung 53 zu sehende, stufig abfallende IGF- I Konzentration abhängig von der Dosis in Prozent aufgeführt.

	Vehikel	4mg/kg	8mg/kg	80mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	1574 \pm 177,3	1466 \pm 331,7	1311 \pm 134,3	1157 \pm 105,4
Wert in % mit Vehikel als 100%		93	83,3	73,5
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		7	16,7	26,5

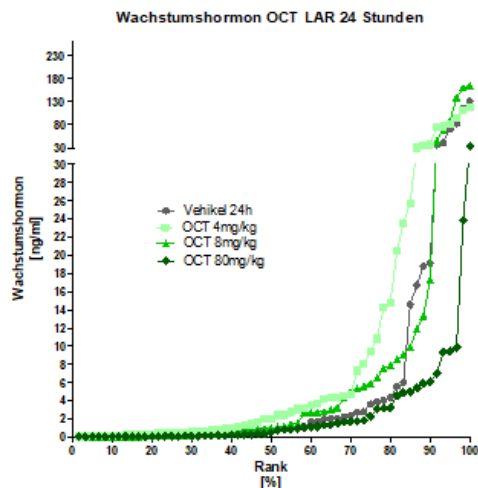
In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm die jeweilige SD angegeben. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des IGF- I in dieser Dosisgruppe statt.

Tabelle 19: Suppression IGF- I 24h nach OCT LAR Injektion.

B, Wachstumshormon

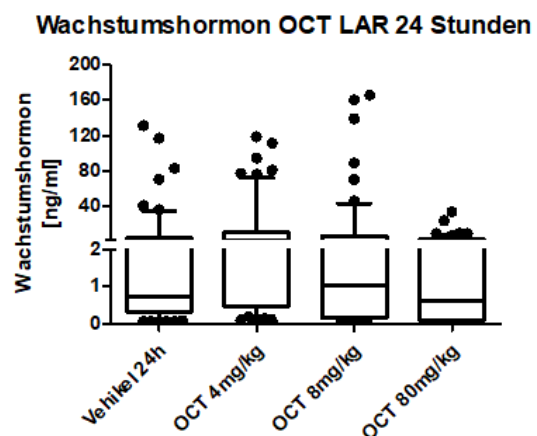
Die Gabe von OCT LAR resultierte nach 24 Stunden in signifikant ($p < 0,01$) niedrigeren GH-Konzentrationen der AUC der 80mg/kg- Gruppe im Vergleich zu der 4 beziehungsweise 8mg/kg Dosisgruppe, während die Konzentrationen des Wachstumshormons der Vehikelgruppe sich von keiner Gruppe statistisch signifikant unterschied. Hierbei zu beachten ist, dass der Unter-

schied auf einem Anstieg des Wachstumshormons unter 4 und 8mg/kg beruht, da auch eine Gabe von 80mg/kg nur minimalen Einfluss auf die AUC hat (siehe Abbildung 54 und Tabelle 20). Die Suppression unter 1ng/ml beträgt 56% (Vehikel), 40% (4mg/kg), 52% (8mg/kg) und 58% (80mg/kg).



Vergleich der Behandlungsgruppen mit PAS LAR Vehikel, 4, 8, und 80 mg/kg. Auf der Y-Achse GH Konzentrationen bis 230 ng/ml, auf der X-Achse Angaben in Prozent.

Abbildung 55: Wachstumshormonkonzentrationen 24h nach OCT LAR Injektion.



Dargestellt ist durch Box und Ausläufer die 10.-90. Perzentile. Der Strich innerhalb der Box gibt den Median wieder, die schwarzen Punkte stehen für Werte außerhalb der Perzentilen.

Abbildung 54: Boxplot GH 24h nach OCT LAR Injektion.

Der Anstieg der GH- Durchschnittswerte ist in Tabelle 20 abzulesen. Unter 4mg/kg stieg dieser auf 140,7% seines Ausgangswertes (Durchschnittswert des Vehikel, 10,16 ng/ml = 100%) an. Unter Therapie mit 8mg/kg waren es noch 134,5%. Nur 80mg/kg an OCT LAR führten zu einer Reduktion des Durchschnittswertes um 73,8%.

	Vehikel	4mg/kg	8mg/kg	80mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	10,16 \pm 26,33	14,30 \pm 28,37	13,67 \pm 36,25	2,66 \pm 5,59
Wert in % mit Vehikel als 100%		140,7	134,5	26,2
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %				73,8

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm die jeweilige SD angegeben. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des GH in dieser Dosisgruppe statt.

Tabelle 20: Suppression GH 24h nach OCT LAR Injektion.

3.3.3 Long acting Somatostatin Analoga (LAR) 14 Tage nach Injektion

3.3.3.1 Pasireotid-LAR

A, IGF- I

14 Tage nach einmaliger Injektion des langwirksamen Pasireotids waren folgende signifikanten Unterschiede nachweisbar (vergleiche Abbildung 56):

1085ng/ml betrug die Konzentration im Serum der Vehikeltiere und dieser Wert war signifikant höher ($p < 0,0001$) als die IGF- I Konzentrationen in der

4mg/kg-Gruppe (784,0ng/ml), 8mg/kg-Gruppe (619,3ng/ml) und der 80mg/kg-Gruppe (353,8 ng/ml).

Die IGF- I Konzentration im Serum der 80mg/kg-Gruppe (619,3ng/ml) war zudem signifikant geringer verglichen mit der 8mg/kg-, (353,8ng/ml) und 4mg/kg- Gruppe (731,2ng/ml).

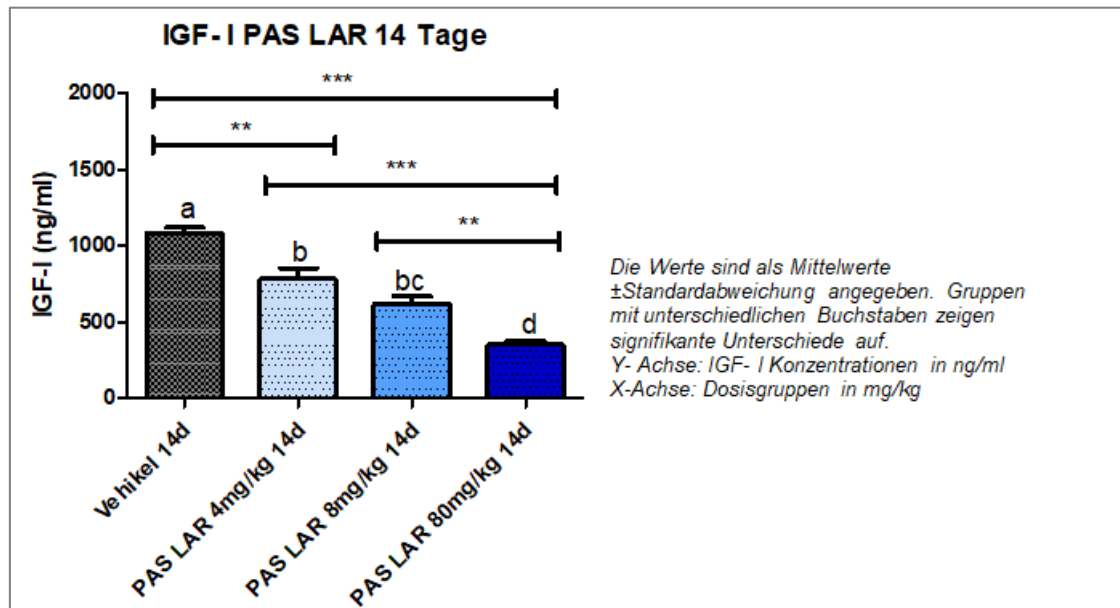


Abbildung 56: IGF- I 14d nach PAS LAR Injektion.

Suppression in Prozent im Verhältnis zum Vehikel:

	Vehikel	4mg/kg	8mg/kg	80mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	1085 \pm 84,15	784,0 \pm 176,6	619,3 \pm 123,4	353,8 \pm 55,31
Wert in % mit Vehikel als 100%		72,3	57	32,6
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		27,7	43	67,4

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm jeweiliger SD angegeben.
In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt.
In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des IGF- I in dieser Dosisgruppe statt.

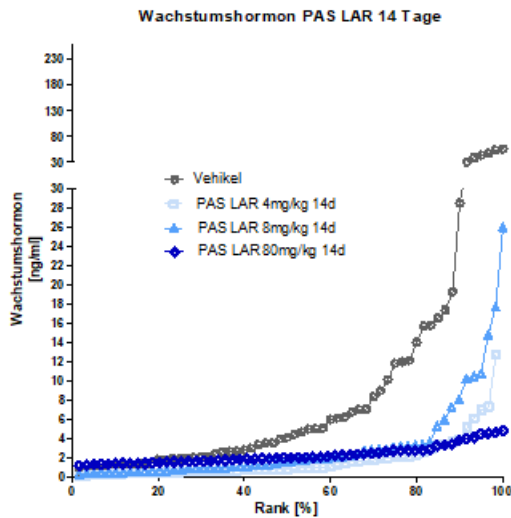
Tabelle 21: Suppression IGF- I 14d nach PAS LAR Injektion.

B, Wachstumshormon

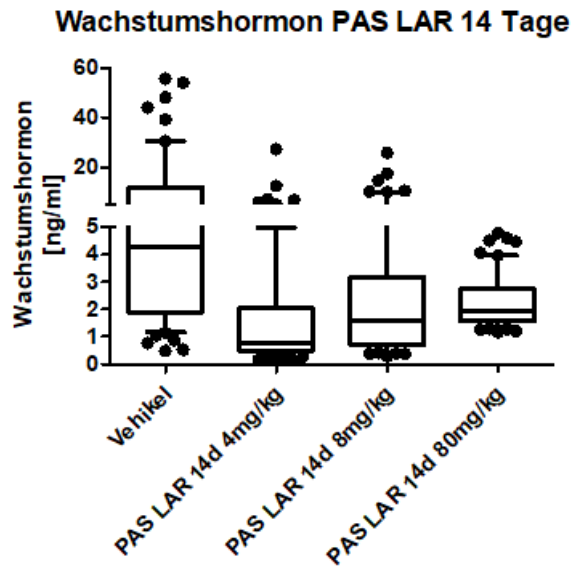
14 Tage nach Injektion von PAS LAR waren die AUC der Versuchstiere im Vergleich zu der AUC der Vehikelgruppe signifikant ($p = 0,0001$) erniedrigt.

Nach Injektion von 4mg/kg lagen 60% der Werte unter 1ng/ml, nach 8mg/kg 37%, nach 80mg/kg jedoch keiner der gemessenen Werte (vergleiche Abb. 57). Allerdings sind die Werte der 80mg/kg homogen zwischen 1-5ng/ml verteilt, und der Graph verläuft fast horizontal, während alle anderen Versuchstiere größere Schwankungen aufweisen (siehe Abbildung 57).

Aus der 4mg/kg- Gruppe wurde ein Wert (27,41ng/ml) als Ausreißer herausgenommen.



Vergleich der Behandlungsgruppen mit PAS LAR Vehikel, 4,8, und 80 mg/kg. Auf der Y-Achse GH Konzentrationen bis 230 ng/ml, auf der X-Achse Angaben in Prozent.



Dargestellt ist durch Box und Ausläufer die 10.-90. Perzentile. Der Strich innerhalb der Box gibt den Median wieder, die schwarzen Punkte stehen für Werte außerhalb der Perzentilen. Angaben in Prozent.

Abbildung 57: Wachstumshormonkonzentrationen 14 Tage nach PAS LAR Injektion. **Abbildung 58:** Boxplot GH 14 Tage nach PAS LAR Injektion.

Beim Vergleich der Durchschnittswerte (Tabelle 22) fällt auf, dass 4mg/kg den Durchschnittswert auf 17,2% senken konnten, während es unter Therapie mit 80mg/kg nur noch 23,1% waren. Am wenigsten wirksam war die Injektion von 8mg/kg; der Durchschnittswert lag bei 32,9% im Vergleich zur Vehikelgruppe.

	Vehikel	4mg/kg	8mg/kg	80mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	9,78 \pm 13,45	1,68 \pm 2,19	3,22 \pm 4,66	2,26 \pm 0,94
Wert in % mit Vehikel als 100%		17,2	32,9	23,1
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		82,8	67,1	76,9

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm jeweiliger SD angegeben. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des GH in dieser Dosisgruppe statt.

Tabelle 22: Suppression GH 14d nach PAS LAR Injektion.

3.3.3.2 Octreotid-LAR

A, IGF- I

Die IGF- I Konzentrationen in den Seren der einzelnen Dosisgruppen wiesen 14 Tage nach einmaliger Octreotid LAR Injektion keine signifikanten Unterschiede auf (Abb.59).

Der Ausschluss eines Ausreißers (fünftes Tier der 4mg/kg- Gruppe) hatte keinen Einfluss auf die Signifikanz.

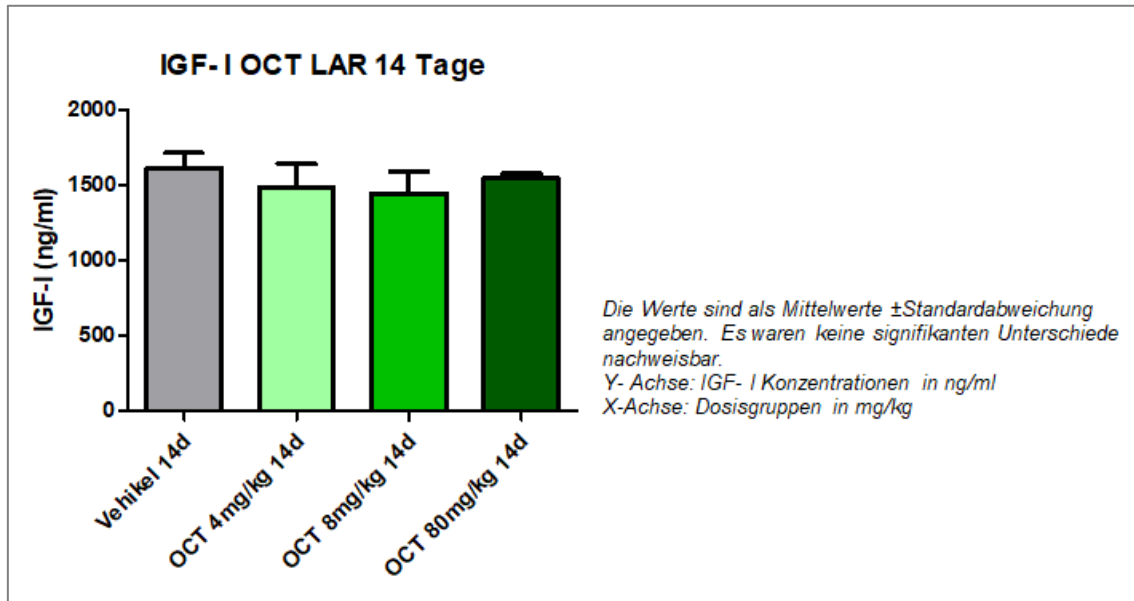


Abbildung 59: IGF- I 14 Tage nach OCT LAR Injektion.

Suppression unter Therapie mit verschiedenen Dosen OCT LAR in Prozent:

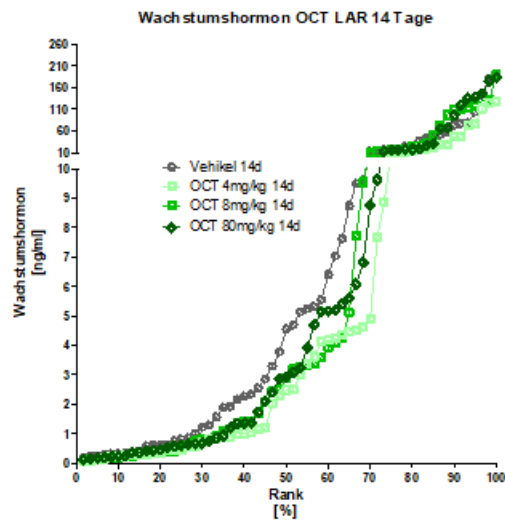
	Vehikel	4mg/kg	8mg/kg	80mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml ± SD	1618 ± 97,43	1486 ± 157,7	1449 ± 142,4	1549 ± 28,53
Wert in % mit Vehikel als 100%		91,8	89,5	95,7
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		8,2	10,5	4,3

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml ± die jeweilige SD angegeben.
 In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt.
 In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des IGF- I in dieser Dosisgruppe statt.

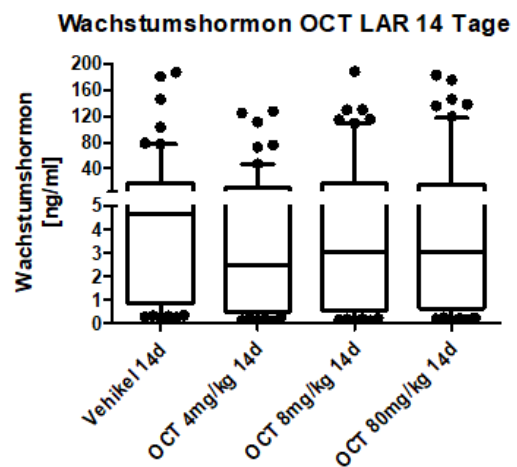
Tabelle 23: Suppression IGF- I 14d nach OCT LAR Injektion.

B, Wachstumshormon

Wie auch in Abbildung 60 gut zu sehen, war 14 Tage nach der Injektion von Octreotide LAR kein wesentlicher Unterschied auszumachen. Stattdessen lagen die Werte aller Dosisgruppen gleichmäßig um die gemessenen Werte der Tiere, welche Vehikel erhalten hatten. Auch in der statistischen Auswertung der AUC war keine Signifikanz nachweisbar.



Vergleich der Behandlungsgruppen mit OCT LAR Vehikel, 4,8, und 80mg/kg. Auf der Y-Achse GH Konzentrationen bis 230ng/ml, auf der X-Achse Angaben in Prozent.



Dargestellt ist durch Box und Ausläufer die 10.-90. Perzentile. Der Strich innerhalb der Box gibt den Median wieder, die schwarzen Punkte stehen für Werte außerhalb der Perzentilen. Angaben in Prozent.

Abbildung 61: Wachstumshormonkonzentrationen 14d nach OCT LAR Injektion. **Abbildung 60:** Boxplot GH 14d nach OCT LAR Injektion.

Nur nach Gabe von 4mg/kg war überhaupt eine Suppression (um 35,8%) nachweisbar. 8 und 80mg/kg führten zu einem Anstieg der Durchschnittswerte des GH (Tabelle 24).

	Vehikel	4mg/kg	8mg/kg	80mg/kg
Durchschnittswert in ng/ml \pm SD	22,27 \pm 41,72	14,30 \pm 29,45	22,85 \pm 43,14	23,02 \pm 46,46
Wert in % mit Vehikel als 100%		64,2	102,6	103,4
Suppression im Vergleich zum Vehikel in %		35,8		

In der ersten Zeile sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Dosisgruppen in ng/ml \pm die jeweilige SD angegeben. In der zweiten folgt die Umrechnung des Durchschnittswertes in %, wobei der Durchschnittswert der Vehikelgruppe die Referenz (=100%) darstellt. In der dritten Zeile ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zeile in % wiedergegeben. Dies entspricht der Suppression. Ist kein Wert eingetragen, so fand ein Anstieg des GH in dieser Dosisgruppe statt.

Tabelle 24: Suppression GH 14 Tage nach OCT LAR Injektion.

3.4 Hepatische Expression von IGF- I, Wachstumshormonrezeptor und IGF binding protein 3

3.4.1 Long-acting Somatostatin Analoga (LAR) 24 Stunden nach Injektion

3.4.1.1 Pasireotid

A, IGF- I

24 Stunden nach Injektion von Pasireotid LAR war die relative hepatische Expression von Insulin-like growth factor-1 (IGF- I) in allen Dosisgruppen im Vergleich zur Vehikelgruppe statistisch signifikant geringer ($p < 0,001$). Die Versuchstiere, welche Vehikel injiziert bekommen hatten, zeigten eine relative Expression von $1 \pm 0,28$, die Dosisgruppen von $0,109 \pm 0,04$ (4mg/kg), $0,121 \pm 0,03$ (8mg/kg) und $0,111 \pm 0,06$ (80mg/kg).

Bei Tier Nummer 4 der 8mg/kg- Gruppe war die Expression von IGF- I technisch nicht messbar.

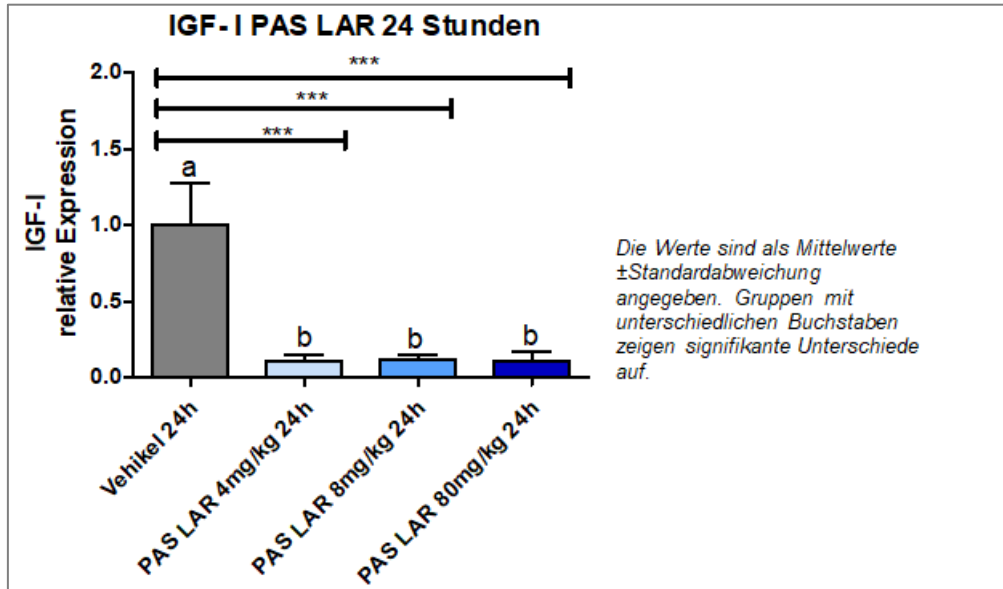


Abbildung 62: Hepatische Expression von IGF-I 24 Stunden nach PAS LAR Injektion.

B, Wachstumshormonrezeptor

Die relative hepatische Expression des Wachstumshormonrezeptors (growth hormone receptor, GHR) war 24 Stunden nach Injektion von Pasireotid LAR nicht signifikant erniedrigt (Abb.63)

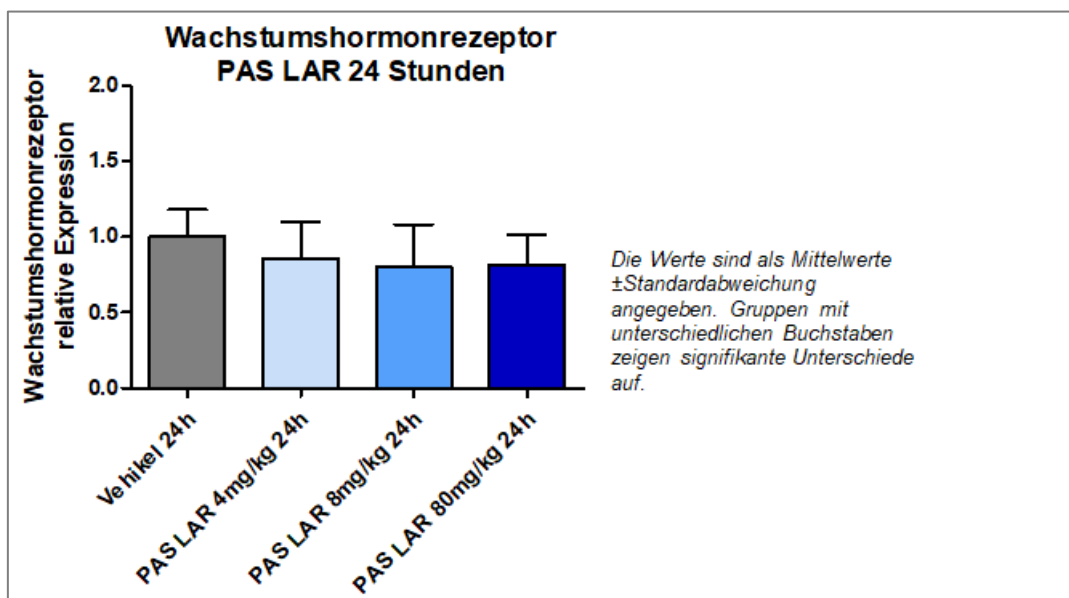


Abbildung 63: hepatische Expression des GH Rezeptors 24 Stunden nach PAS LAR Injektion.

C, IGF binding protein 3

Die Dosisgruppen 4,8 und 80mg/kg unterschieden sich 24 Stunden nach Injektion von Pasireotid LAR signifikant ($p < 0,0001$) von der Vehikelgruppe hinsichtlich der hepatischen Expression von IGF binding protein 3. Die relative Expression betrug in der Vehikelgruppe $1,000 \pm 0,3$, in der 4mg/kg Dosisgruppe $0,444 \pm 0,09$, der 8mg/kg Gruppe $0,441 \pm 0,11$ und bei den Versuchstieren, die 80mg/kg erhalten hatten $0,387 \pm 0,16$.

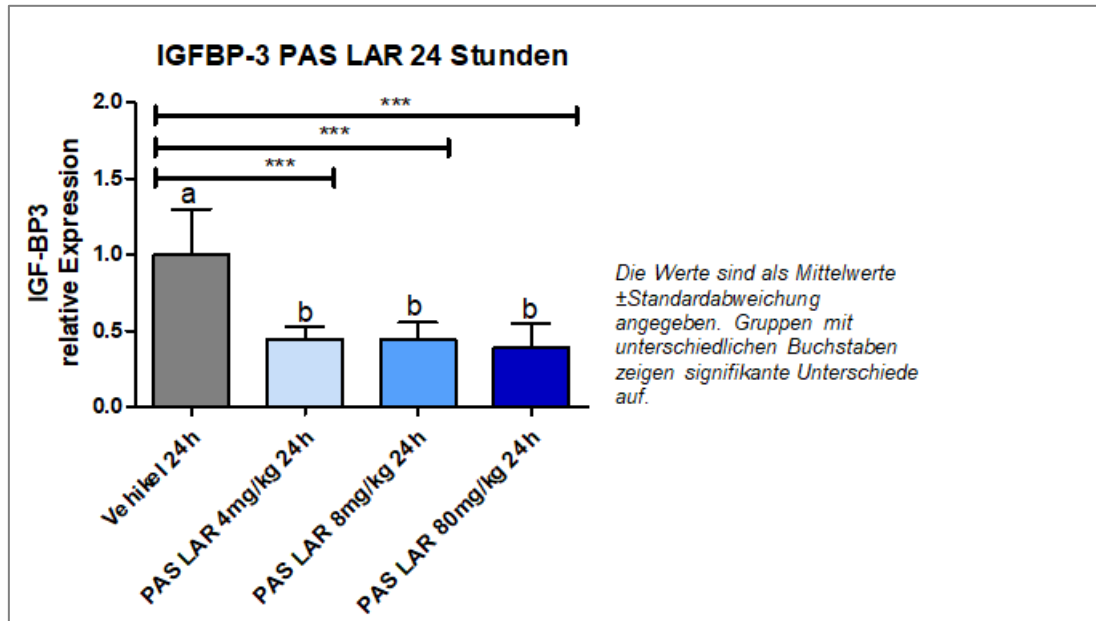


Abbildung 64: hepatische Expression von IGFBP-3 24h nach PAS LAR Injektion.

3.4.1.2 Octreotid

A, IGF- I

Hinsichtlich der relativen Expression von IGF- I zeigten die Tiere der 4mg/kg- Gruppe eine erhöhte Expression ($1,26 \pm 0,33$), welche sich signifikant von der 80mg/kg- Gruppe ($0,82 \pm 0,25$) unterschied.

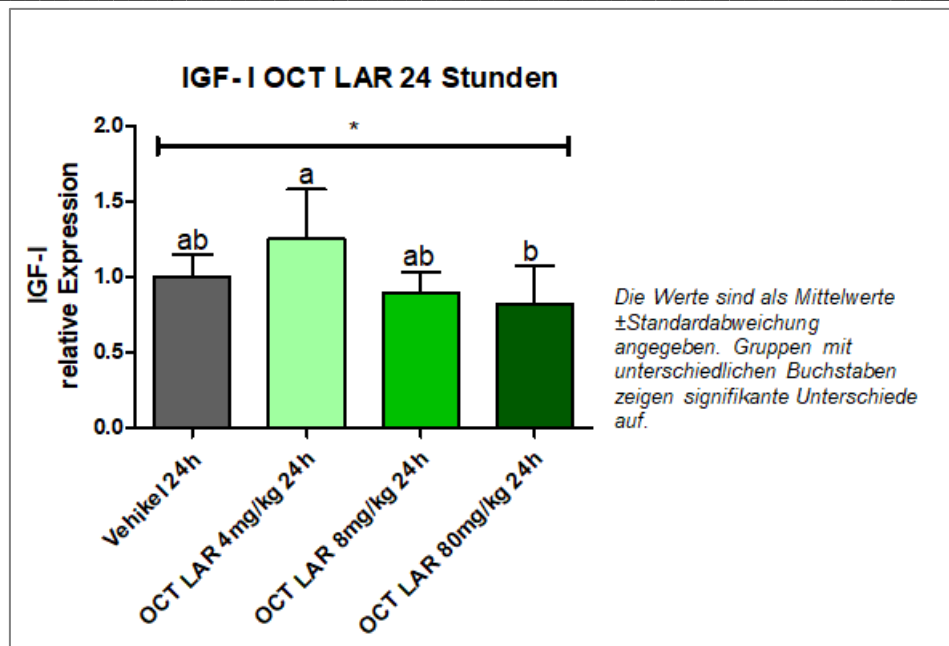


Abbildung 65: hepatische Expression von IGF- I 24 Stunden nach OCT LAR Injektion.

B, Wachstumshormonrezeptor

Die relative hepatische Expression des GH- Rezeptors war 24 Stunden nach Injektion in keiner der Gruppen signifikant erhöht oder erniedrigt.

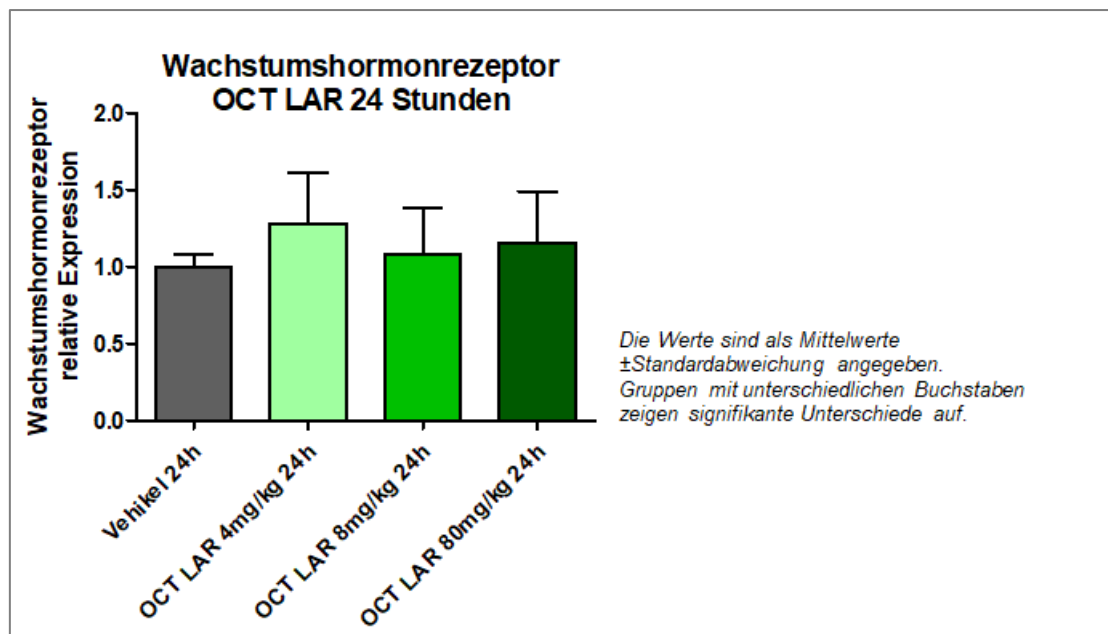


Abbildung 66: hepatische Expression des GH Rezeptors 24h nach OCT LAR Injektion.

C, IGF binding protein 3

Hinsichtlich eines Unterschiedes der relativen hepatischen Expression von IGF binding protein 3 war keine statistische Signifikanz innerhalb der Gruppen nachweisbar.

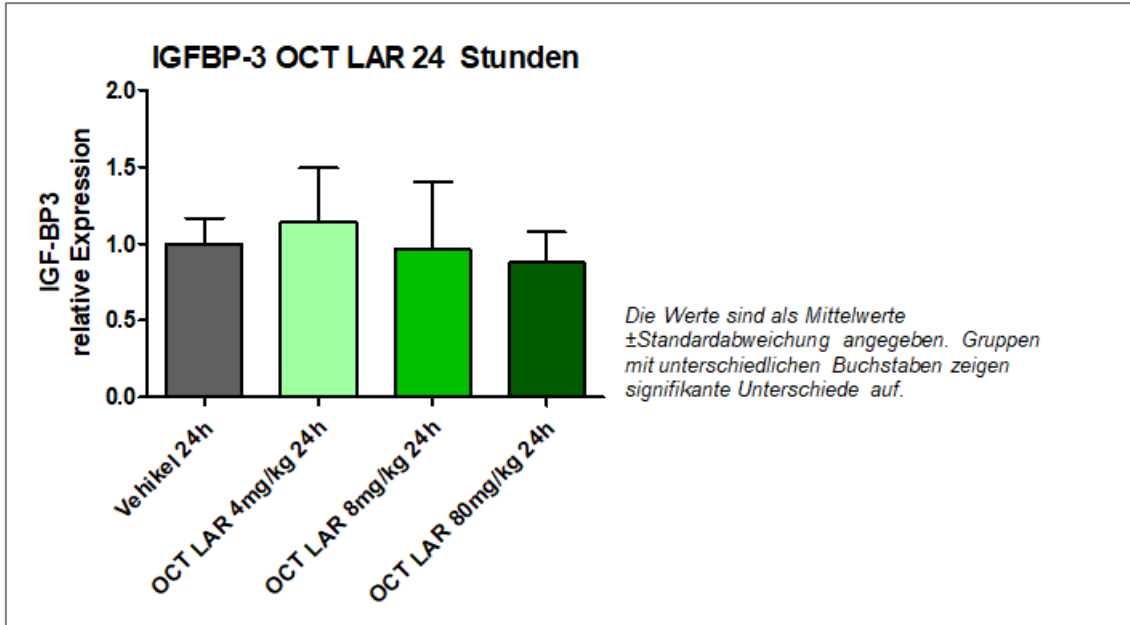


Abbildung 67: hepatische Expression des IGFBP-3 24 Stunden nach OCT LAR Injektion.

3.4.2 3.4.2 Long-acting Somatostatin Analoga (LAR) 14 Tage nach Injektion

3.4.2.1 Pasireotid

A, IGF- I

Die relative hepatische Expression war 14 Tage nach Injektion von 4, 8 und 80mg/kg bei allen drei Versuchsgruppen im Vergleich zum Vehikel signifikant reduziert. Die Vehikelgruppe lag bei $1,00 \pm 0,3$, die Versuchsgruppe, welche 4mg/kg erhalten hatte bei $0,51 \pm 0,16$, die 8mg/kg- Gruppe bei $0,40 \pm 0,1$ und die Versuchsgruppe nach einer Injektion von 80mg/kg bei $0,18 \pm 0,06$. Die Ergebnisse der 4mg/kg- Gruppe unterschieden sich zusätzlich signifikant von denen der 80mg/kg- Gruppe.

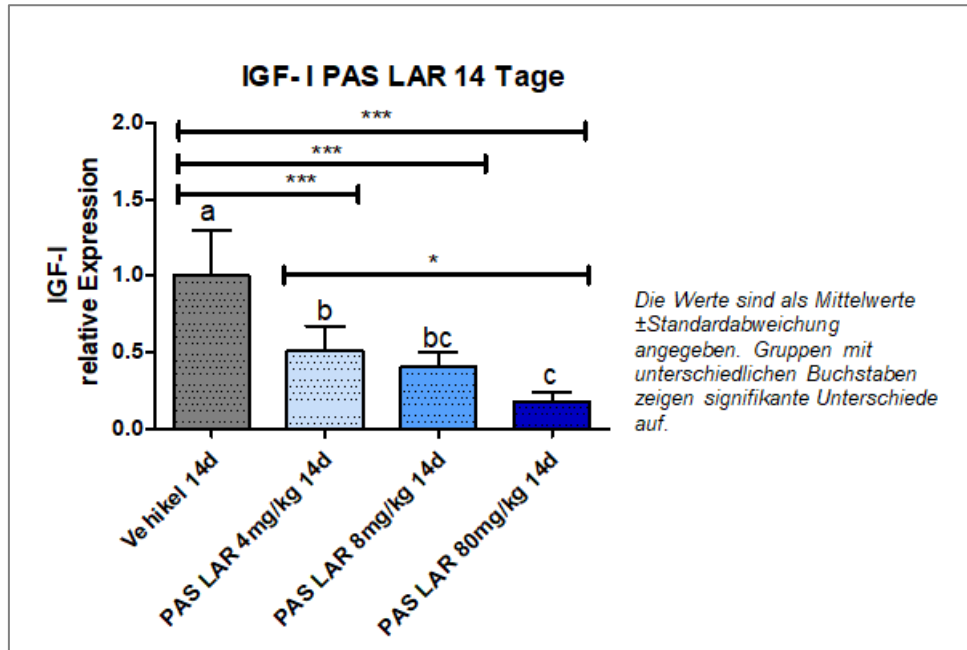


Abbildung 68: hepatische Expression von IGF- I 14 Tage nach PAS LAR Injektion.

B, Wachstumshormonrezeptor

14 Tage nach Injektion war ein signifikanter Unterschied der relativen Expression des GH-Rezeptors in der Leber zwischen Vehikel und allen Dosisgruppen, sowie zwischen der 4mg/kg-Gruppe und der Versuchsgruppe, die 80mg/kg erhalten hatte, nachweisbar. Die unterschiedlichen Gruppen lagen hierbei bei $1,00 \pm 0,20$ (Vehikel), $0,67 \pm 0,09$ (4mg/kg), $0,5 \pm 0,10$ (8mg/kg) und $0,41 \pm 0,13$ (80mg/kg). Tier drei der 4mg/kg- Gruppe fiel als Ausreißer aus der statistischen Analyse.

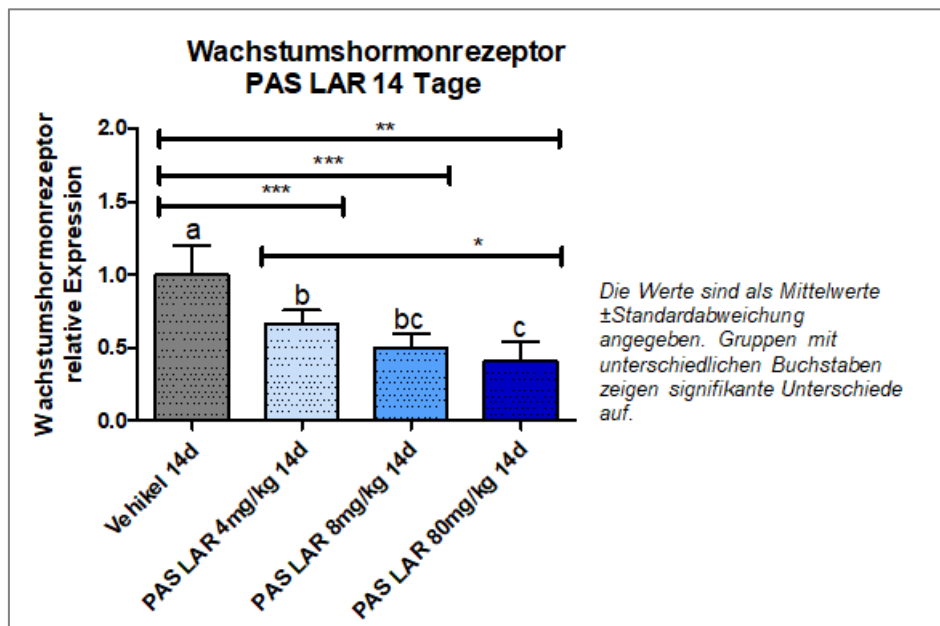


Abbildung 69: hepatische Expression des GH Rezeptors 14 Tage nach PAS LAR Injektion.

C, IGF binding protein 3

Die hepatische Expression von IGFBP-3 war signifikant unterschiedlich zwischen den Versuchstieren der Vehikelgruppe ($1,00 \pm 0,15$) und 80mg/kg- Gruppe ($0,52 \pm 0,39$), sowie zwischen der 4mg/kg-, ($1,15 \pm 0,17$) und 80mg/kg- Gruppe. Dabei ist anzumerken, dass die 4mg/kg- Gruppe eine erhöhte Expression des IGF-BP3 im Vergleich zur Vehikelgruppe aufwies, während sowohl die 8-, also auch 80mg/kg- Gruppe erniedrigte relative Werte zeigten (siehe Abb.70)

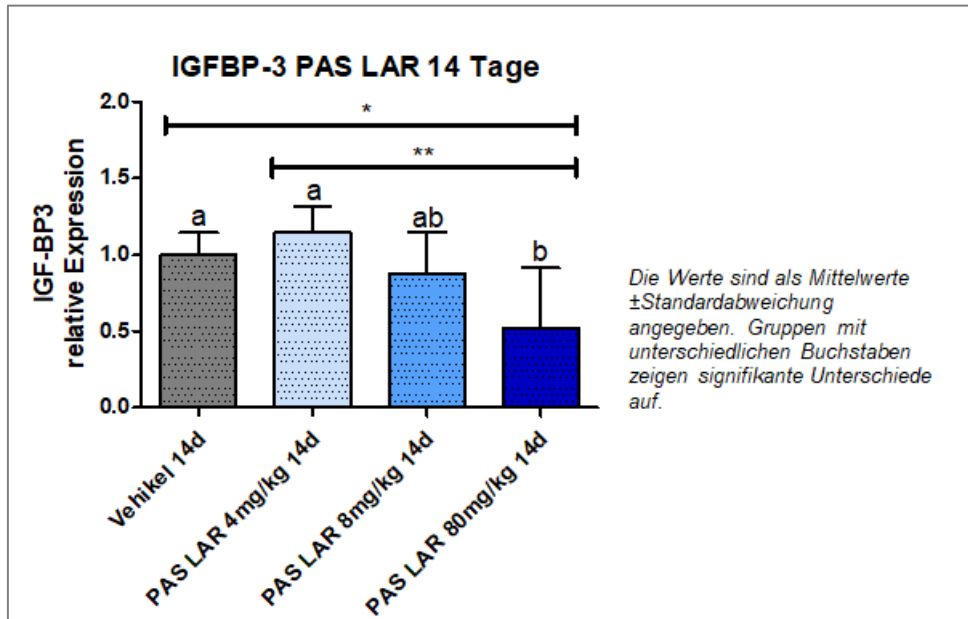


Abbildung 70: hepatische Expression des IGFBP-3 14 Tage nach PAS LAR Injektion.

3.4.2.2 Octreotid

A, IGF- I

Hinsichtlich der relativen Expression von IGF- I waren keine statistisch signifikanten Unterschiede 14 Tage nach Injektion von Octreotid LAR nachweisbar.

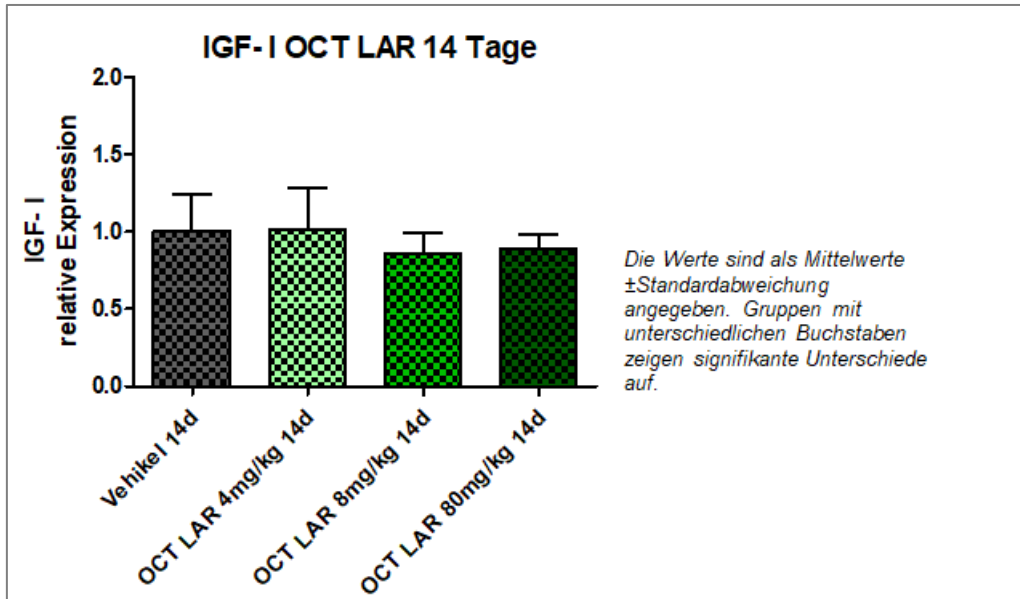


Abbildung 71: hepatische Expression von IGF- I 14 Tage nach OCT LAR Injektion.

B, Wachstumshormonrezeptor

14 Tage nach Injektion von Octreotid LAR waren keine signifikanten Unterschiede in der Expression des GH- Rezeptors nachweisbar. An Abbildung 73 ist ersichtlich, dass die Versuchstiere der 8mg/kg- Gruppe etwas verringerte Expressionswerte aufzeigten, während die 80mg/kg- Versuchsgruppe vermehrt GH- Rezeptoren exprimierte. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

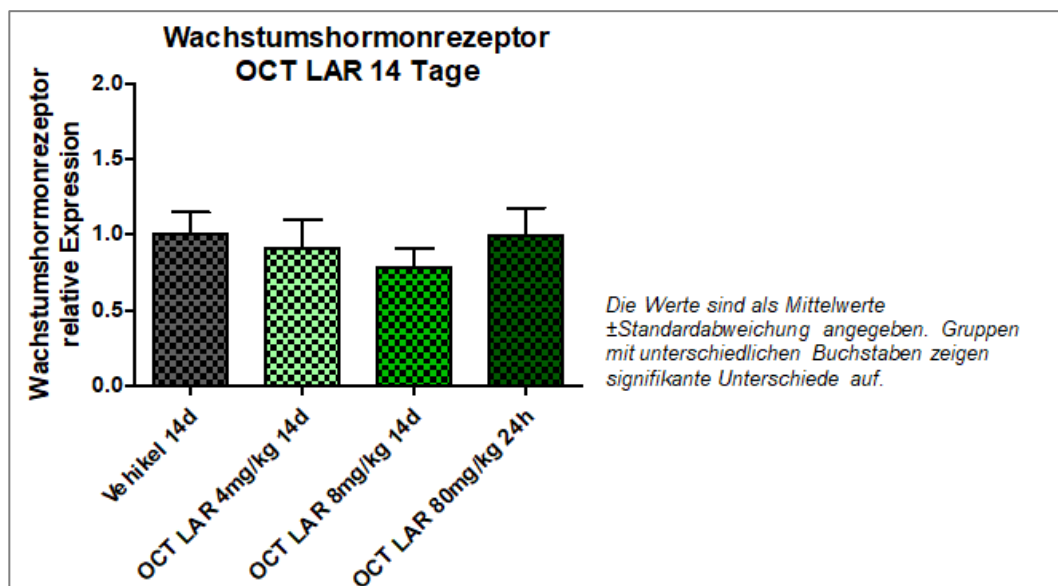


Abbildung 72: hepatische Expression des GH Rezeptors 14 Tage nach OCT LAR Injektion.

C, IGFBP-3

Die relative Expression von IGFBP-3 unterschied sich zwischen den verschiedenen Dosisgruppen nur minimal; die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

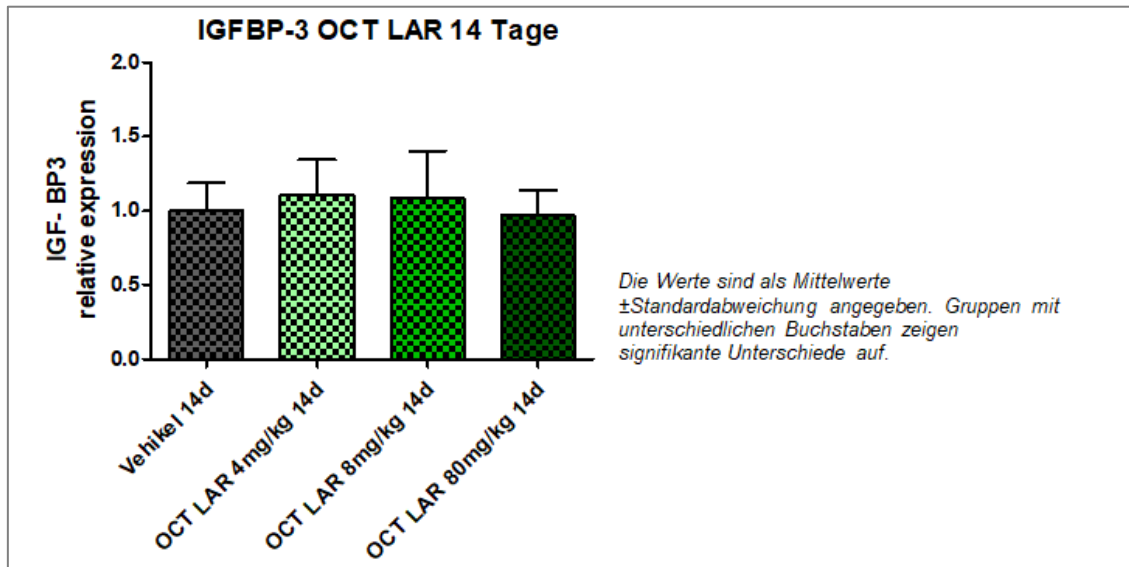


Abbildung 73: hepatische Expression von IGFBP-3 14 Tage nach OCT LAR Injektion.

4 Diskussion

4.1 Kritische Betrachtung von Material und Methoden

Ratten werden seit vielen Jahren in der medizinischen, pharmakologischen und toxikologischen Forschung als Model verwendet, da an ihnen auch komplexe Krankheitsbilder studiert und eine Vielzahl der Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können [62, 63].

Die Resultate der vorliegenden Arbeit stammen von Experimenten mit männlichen Lewis-Ratten. Da es logistisch nicht möglich war, alle Experimente zum gleichen Zeitpunkt durchzuführen, mussten der Versuch in zwei Telexperimente aufgeteilt werden. Die Versuchsbedingungen in beiden Telexperimenten waren jedoch identisch, sodass ein Einfluss auf die Ergebnisse unwahrscheinlich, diese Möglichkeit jedoch nicht ausschließbar ist. Zudem hatte jedes Telexperiment eigene Vehikelgruppen.

Eine Durchführung aller Experimente in weiblichen Lewis-Ratten ist anzustreben, um ein unterschiedliches Ansprechen der Geschlechter auf die SSA nachweisen oder ausschließen zu können. In den meisten Medikamentenstudien zur Akromegalie wird unabhängig von dem Geschlecht randomisiert. In einer retrospektiven Studie von Cozzi et al. (2004) zeigte aber der Vergleich der GH- Werte von Männern, menstruierenden und postmenopausalen Frauen niedrigere IGF- I Werte bei menstruierenden Frauen und eine bessere Kontrolle dieser trotz höherer GH- Konzentrationen [64].

Sehr interessant, und im Rahmen einer zukünftigen Doktorarbeit durchführbar, wäre auch die Berücksichtigung eines anderen geeigneten Tiermodells (siehe Einleitung), welches tatsächlich pathologische Wachstumshormonwerte aufzeigt. Dies würde die Interpretation und den Vergleich der Ergebnisse zu denen in betroffenen Patienten erleichtern.

Der in dieser Studie verwendete Immunoassay (Millipore) zum Nachweis von GH wurde mit einer Spezifität von 100% deklariert. Somit sollte eine Kreuzreaktivität mit anderen Hormonen ausgeschlossen sein. Allerdings war der Assay nur bis 0,07ng/ml sensitiv. Einige der gemessenen Konzentrationen lagen jedoch darunter. Auf Grund der Sensitivität wurden diese vom Photometer mit < 0,07 ng/ml als Resultat angegeben und als 0,07ng/ml in die Berechnungen integriert. Diese Einschränkung limitierte jedoch die Genauigkeit zur Angabe der Ergebnisse und könnte vor allem bei der Berechnung der AUC Einfluss gehabt haben.

Die real-time PCR ist heutzutage das wichtigste und sensitivste Verfahren, um die Anzahl an Kopien eines bestimmten Genabschnittes zu quantifizieren [65, 66].

Allerdings hat auch die rt-PCR, trotz hoher Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit Grenzen, die teilweise auf vor der Amplifikation durchgeführten Schritten beruhen.

Bei der Wahl der Primer wurde, wie von Bustin beschrieben [66], darauf geachtet, dass diese intronspanning sind, das heißt, dass die jeweilige Zielsequenz auf zwei benachbarten Exons liegt. Dieses Vorgehen reduziert die Wahrscheinlichkeit für falsche positive Ergebnisse.

Die Isolation der RNA, die die Basis der Expressionsanalyse darstellt und nicht nur das Ergebnis, sondern auch die Reproduzierbarkeit wesentlich beeinflusst, ist ein problematischer Schritt [65, 67]. Durch Wahrung größter Sorgfalt bei Aufbewahrung und Transport des Gewebes und anschließender Extraktion der RNA wurde versucht, der Fragilität der RNA gerecht zu werden und einen Abbau durch RNAsen zu verhindern. Da die Qualität der RNA ausschlaggebend ist, wurde von Bustin und Nolan die Prüfung aller RNA- Proben auf ribosomale 28S und 18S RNA Bande durch Gelelektrophorese oder einen Bioanalyzer vorgeschlagen [65].

Dies wurde von uns nicht durchgeführt. Stattdessen begegneten wir diesem Problem durch Messung eines sogenannten housekeeping genes als Referenz bei jeder durchgeführten real-time PCR. In dieser Studie fiel die Wahl auf HPRT, das Gen der Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyltransferase, welche von jeder Zelle zur Wiederverwertung der Purine benötigt wird [68].

Housekeeping genes werden von jeder Zelle exprimiert und unterliegen keiner oder nur geringer Kontrolle, sodass sie als internes Qualitätskriterium gelten. Diese Annahme wird in den letzten Jahren jedoch immer mehr hinterfragt und ihre Aussagekraft, ohne einen eventuellen Einfluss des Experimentes auf ihre Expression untersucht zu haben, vermehrt angezweifelt [65, 69]. Nichtsdestotrotz diente das housekeeping gene in dieser Arbeit als Qualitätsmerkmal.

4.2 Interpretation und kritische Einordnung der Ergebnisse

1973 entdeckten Brazeau et al. im Hypothalamus von Schafen das erste Hormon, welches Einfluss auf die GH- Sekretion hatte: Somatostatin [70, 71].

Es handelt sich bei Somatostatin um ein inhibitorisch wirksames Hormon, welches in zahlreichen Organen und Geweben im menschlichen Organismus seine Wirkung entfaltet und vor

allem im zentralen Nervensystem und der Regulation verschiedener Hormone eine Schlüsselrolle spielt [72, 73]. Es liegt als zwei aktive Formen vor, Somatostatin- 14 und -28 [74]. Somatostatin bindet an seinen G-Protein gekoppelten Rezeptor, welcher in fünf Isoformen vorliegt (Sstr1-5), und vermittelt dadurch seine Wirkung [72]. Auf Grund seiner sehr kurzen Halbwertszeit von zwei bis drei Minuten [73] wäre es als Therapie nur als konstante Infusion wirksam. Deshalb wurden Analoga mit längerer Halbwertszeit und höherem pharmakologischem Potenzial entwickelt.

Octreotid und Pasireotid gehören beide zu den Somatostatinanaloga, weisen aber unterschiedliche Rezeptorspezifität auf. Der Somatostatinrezeptor wird in fünf Subtypen im Körper exprimiert, wobei Hypophysenadenome vor allem die Subtypen 2 und 5 exprimieren [75, 76]. Während OCT vor allem an den Subtyp 2 bindet, zeichnet sich Pasireotid durch seine hohe Affinität zu 1-3, aber vor allem zu Sstr5 aus, an welchen es mit vierzigfach höherer Affinität als Octreotid bindet [76]. Diese Rezeptoraffinität scheint für die unterschiedlich gute Wirksamkeit der Medikamente und den Ausprägungsgrad der Nebenwirkungen mit verantwortlich zu sein.

Die höhere Wirksamkeit von Pasireotid bezüglich der Suppression der Hormone, verglichen mit Octreotid, wurde in mehreren Studien beschrieben [35, 36]. Auch im Rahmen unserer Dosisexperimente zur Suppression von GH und IGF- I stellte sich Pasireotid als überlegen dar. Die Überlegenheit bezieht sich in diesem Kontext auf die stärkere Suppression der genannten Hormone. Patienten mit Akromegalie stellen sich jedoch häufig mit Diabetes mellitus Typ 2 vor, weshalb die höhere Tendenz zu Hyperglykämie unter Pasireotid Therapie ein unerwünschter, in Einzelfällen bedenklicher Nebeneffekt ist.

Es lassen sich einige wichtige Kernaussagen dieser Arbeit festhalten:

Zum einen führte Pasireotid LAR über 14 Tage zu signifikant niedrigerem Körper-, und Lebergewicht, sowie zu einem signifikant erniedrigten Gewicht des epididymalen Fettdepot. Die Tendenz zur geringeren Gewichtszunahme zeichnete sich schon nach 24 Stunden ab.

Zudem induzierte Pasireotid eine dosisabhängige Zunahme der Blutglukose nach zehnmaliger Injektion und 24 Stunden nach LAR Gabe. 8mg/kg führten auch 14 Tage nach Injektion noch zu signifikant erhöhten Blutglukosespiegeln. Octreotid hingegen senkte die Blutglukosekonzentration tendenziell.

Außerdem war eine Suppression von GH und IGF- I nach der Gabe von beiden PAS Präparaten und zu allen Untersuchungszeitpunkten detektierbar. Die einzige Ausnahme war 0.1 mg/kg PAS LAR, welches keinen signifikanten Effekt aufwies. Wahrscheinlich ist, dass die Dosis zu gering war, um GH oder IGF- I wirksam zu senken. Die Signifikanz der Unterschiede in der maximalen Suppression variierte nach Dosis.

Octreotid zeigte nach 14 Tagen kaum noch eine Wirkung mehr auf GH oder IGF- I.

Eine dosisabhängige IGF- I Senkung war bei den kurzwirksamen, niedrige Dosis und LAR Präparaten des Pasireotids nach 14 Tagen zu beobachten. Octreotid LAR führte nach 24 Stunden dosisabhängig zu einer Reduktion des zirkulierenden IGF- I.

Ein Zusammenhang zwischen prozentualer GH-, und folgender IGF- I Suppression war nicht nachweisbar. Außerdem war eine extreme Suppression des GH- Spiegels nicht immer gleichbedeutend mit einer extremen Reduktion der IGF- I Werte.

PAS LAR erniedrigte die relative hepatische Expression von IGF- I und IGF binding protein nach 24 Stunden und 14 Tagen. Zudem war nach 14 Tagen auch die Expression des GH- Rezeptors signifikant reduziert.

In allen Teilexperimenten war Pasireotid in Hinblick auf GH-, und IGF- I Suppression Octreotid überlegen, außer in der 0,1mg/kg Dosisgruppe.

Schlussendlich scheint Pasireotid seine pharmakologische Wirkung nicht nur über eine Reduktion der hypophysären GH- Sekretion, sondern auch durch direkte hepatische Effekte zu erzielen. Diese Schlussfolgerung liegt nahe, da keine strikt lineare Korrelation zwischen der prozentualen GH- und der prozentualen IGF- I Suppression gefunden wurde (zum Beispiel führte eine 80% Inhibition der GH-Sekretion nicht zu einer 80%-Inhibition der IGF-I Sekretion).

Mögliche Mechanismen, die diese zusätzliche (potenzielle) hepatischen Wirkung von Pasireotid erklären könnten, sind die molekularbiologischen Expressionsdaten, welche auf eine Reduktion der hepatischen Expression von IGF- I, IGF binding protein 3 (nach 8 und 80mg/kg) und GHR unter Pasireotid-Behandlung hinweisen.

Veränderung der Körper-, und Lebergewichte sowie der perirenal und epididymalen Fettpolster unter Therapie

Durch die Untersuchung von Patienten mit unbehandelter Akromegalie fand man heraus, dass diese vermehrt extrazelluläres Wasser im Körper eingelagert hatten und eine erhöhte fettfreie Körpermasse mit geringerem Körperfett aufwiesen [77-80].

Die biochemische Kontrolle der Erkrankung durch die verfügbaren SSA führte zu einer Abnahme der fettfreien Körpermasse, welche einem Rückgang der morphologischen Symptome [81] entsprach und aber auch zu einer Zunahme des Körperfettes führte. Lin et al. [79] stellten in einer Vergleichsstudie fest, dass vor allem die übermäßige Suppression bis hin zum Mangel an GH in einer Zunahme des viszeralen Fettgewebes mündete.

Da die Versuchstiere nicht an Akromegalie erkrankt waren, ist dies bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Nach zehnmaliger Injektion von Octreotid lag eine dosisabhängige Erniedrigung der durchschnittlichen Körper-, und Lebergewichte, sowie der perirenal Fettdepots am fünften Tag vor. Die Ratten waren zu diesem Zeitpunkt zwischen 7 Wochen + 5 Tage und 9 Wochen + 5 Tage alt. Da Lewis Ratten ausgewachsen ein Gewicht von bis zu 700 g erreichen können [82, 83] und diese Tiere Körpergewichte zwischen 200 und 250 g hatten, sollte eine verminderte Zunahme und keine Abnahme der Ausgangsgewichte als primärer Einfluss als wahrscheinlicher angesehen werden.

Außerdem spielen GH und IGF- I während des physiologischen Wachstums Schlüsselrollen, und ohne ausreichende Konzentration dieser Hormone wird kein normales Wachstum erreicht [84], sodass eine Gewichtszunahme auf Grund des verminderten Längenwachstums ausbleibt.

Lupus et al. konnten im Jahr 2000 in verschiedenen Mausmodellen (GHR negativ, IGF- I negativ, für beides negativ) zeigen, dass die GH/IGF- I Achse einen Großteil des postnatalen Wachstums bestimmt. Ihrer Schätzung nach war GH alleine für 14% des Wachstums verantwortlich, während IGF- I für 35% verantwortlich war. Mäuse, welche weder den GH- Rezeptor, noch IGF- I herstellen konnten, erreichten nur 17% des normalen Mausgewichtes [85].

Konträr zur Gewichtsabnahme bei täglicher Injektion nahmen die mit OCT LAR behandelten Tiere über 14 Tage an Gewicht zu, signifikant war aber nur das Körpergewicht der 80mg/kg-Gruppe. Dies lag mit hoher Wahrscheinlichkeit am schon höheren Durchschnittsgewicht dieser Versuchstiere zu Beginn der Experimente.

Die Argumentation, dass es sich um gesunde Ratten handelte, deren GH zu sehr gesenkt wurde und die Gewichtszunahme somit im Einklang mit den Beobachtungen anderer Studien an

Akromegaliepatienten steht, ist vermutlich unzulänglich. Wie schon erläutert, lagern Akromegaliepatienten nach eskalierter Therapie vermehrt Fett ein [79], denn bei übermäßiger Suppression fällt die katabole Eigenschaft des GH auf den Fettstoffwechsel weg. Allerdings lagen die GH und IGF- I Werte im Bereich derer der Vehikelgruppe, sodass die Erklärung, dass OCT LAR nicht mehr wirksam war und ein normales Wachstum der Tiere stattfand, plausibler erscheint. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass die von uns entnommenen Fettpolster 14 Tage nach Injektion nicht signifikant erhöht waren, sodass eine Fetteinlagerung nicht alleine für die Gewichtszunahme verantwortlich zu sein schien.

Auch die Therapie mit Pasireotid führte zu Veränderungen des Körpergewichts.

Nach fünf Tagen waren die Veränderungen unter 10 und 50 µg/kg- Therapie ausgeprägter als unter 30 µg/kg. 30 µg/kg hatten keinen Einfluss auf Körper-, und Lebergewicht oder die untersuchten Fettdepots, während 10 µg/kg signifikant das Leber-, und 50 µg/kg signifikant das Körpergewicht reduzierten.

24 Stunden und 14 Tage nach PAS LAR Gabe (4,8 und 80mg/kg) waren die Lebergewichte signifikant erniedrigt. Dies galt ebenso - nach 14 Tagen- für das epididymale Fettdepot und das Körpergewicht aller Tiere der drei Versuchsgruppen. Im Vergleich zu Octreotid war im Verlauf tatsächlich eine Abnahme der Körpergewichte zu beobachten (vergleiche Abb. 27). Ob dieser Unterschied nur auf der Abnahme der Leber-, und Fettpolstergewichte basierte, ist nicht zu sagen, da diese nur nach dem Tod der Tiere gewogen werden konnten.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem von Lin et al. [79], zeigt sich eine Diskrepanz. Lin et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Patienten, bei denen nach erfolgreicher Therapie niedrige GH- Werte gemessen wurden ($<5 \mu\text{g/l}$ nach Growth- hormone releasing hormone- arginine Gabe oder IGF- I Werte <2 SD des Normalwertes in Patienten mit drei und mehr Hormonmängeln auf Grund einer insuffizienten Hypophyse), erhöhtes viszerales und Gesamtkörperfett sowie einen erhöhten BMI (body mass index) aufwiesen. Da die Versuchstiere gesund waren und unter PAS LAR eine wirksame GH- Suppression auftrat, kann von einem induzierten Mangel ausgegangen werden. Dementsprechend wäre eine Gewichtszunahme zu erwarten gewesen.

Ein anderer Grund für die Gewichtsabnahme könnte das Medikament selbst gewesen sein, vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass unter Octreotid eine normale Gewichtszunahme zu verzeichnen war. In keiner der bei Fertigstellung der Arbeit vorliegenden Artikel wurde eine Gewichtsabnahme von Patienten unter Pasireotid LAR explizit erwähnt, allerdings tritt Akromegalie im Erwachsenenalter auf, das Korrelat Gigantismus im Kindes,- und Jugendalter.

Auch hier dient die physiologische Rolle der beiden Hormone als Erklärungsansatz. Eine extreme Suppression über 14 Tage könnte durchaus einen Einfluss auf das Wachstum gehabt haben, besonders wenn man davon ausgeht, dass die Ratten sich bei Beginn der Experimente noch in der Phase der Adoleszenz befanden. Die Tiere waren zu dem Zeitpunkt zwischen sieben und acht Wochen alt.

Das Alter und damit die Lebensphase einer Ratte zu bestimmen, ist nicht ganz einfach und auch nicht abschließend geklärt [83]. Berechnet man das Alter anhand eines Vergleiches der gesamten Lebensspanne von Ratten und Menschen (durchschnittlich 3 und 80 Jahre), dann entspricht ein Tag im Leben einer Ratte 26.7 Tagen eines menschlichen Lebens und demnach ein menschliches Jahr 13.8 Rattentagen [86]. Es ergibt sich also ein Alter unserer Ratten von vier bis 5 fünf menschlichen Jahren. Das Problem dieser Berechnung ist die nicht vorhandene Rücksichtnahme auf unterschiedliche Lebensphasen, die Mensch und Ratte schneller oder langsamer erreichen. Sengupta [83] gibt das Erreichen des Erwachsenenalter der Ratten mit circa acht Wochen an, sodass die Tiere genau an der Grenze zwischen jugendlicher- und erwachsener Lebensphase lagen. In der erwachsenen Phase entspricht ein Menschenjahr aber 10.5 Rattentagen [83]. 14 Tage nach Injektion waren die Ratten zwischen neun und 11 Wochen alt. Nimmt man acht Wochen als Eintritt ins Erwachsenenalter, entspräche dies einem menschlichen Alter von 4.5 bis zu 6 Jahren.

Demzufolge hätten Kinder und Jugendliche mit Gigantismus eine bessere Vergleichsgruppe zur Beantwortung der Frage dargestellt. Leider gab es zum Recherchezeitpunkt keine Daten zur Anwendung von Pasireotid bei Kindern oder Jugendlichen mit Gigantismus.

Der Frage, wieso unter PAS LAR nach 14 Tagen eine Gewichtsabnahme stattfand und ob dies mit dem Alter der Patienten zusammenhängt, könnte in zukünftigen Projekten nachgegangen werden.

Wirkung von OCT, OCT LAR, PAS und PAS LAR auf die Blutglukose

Wie zu erwarten, war die Blutglukosekonzentration nach PAS und PAS LAR Therapie in allen Dosisgruppen erhöht.

Ein dosisabhängiger Anstieg der Glukose war schon nach fünf Tagen deutlich, wobei die Erhöhung durch 50µg/kg signifikant war. Eine Dosisabhängigkeit bei täglicher Injektion von Pasireotid wurde auch von Shenouda et al. festgestellt [87]. Dieses Forschungsteam injizierte gesunden Patienten verschiedene Dosen Pasireotids zwischen 150- 1500µg einmal täglich oder

Dosen zwischen 150- 750µg zweimal täglich über acht Tage. Mit ansteigender Dosis stieg auch die Blutglukosekonzentration.

Diese Abhängigkeit von der verabreichten Menge an Pasireotid war auch 24 Stunden nach PAS LAR und PAS LAR niedrige Dosis nachzuvollziehen. Interessanterweise reichten 0.5 und 1.0mg/kg PAS LAR aus, um eine signifikante Erhöhung zu induzieren, obwohl 4 und 8mg/kg zwar nach 24 Stunden einen Anstieg, aber keine signifikante Zunahme auslösten.

14 Tage nach Injektion war keine Dosisabhängigkeit mehr nachzuweisen. 8mg/kg PAS LAR führten innerhalb von 24 Stunden zu einem leichten Anstieg, 14 Tage nach Injektion waren diese Tiere signifikant hyperglykämisch und zwar im Vergleich zu Vehikel und 80mg/kg. Dies bedeutete wiederum, dass eine sehr hohe Dosis von 80mg/kg zwar kurzfristig (24 Stunden) eine Hyperglykämie nach sich zog, die Glukosekonzentration sich über 14 Tage aber wieder in einem Normbereich einpendelte. Dieses Ergebnis sollte allerdings nicht ohne weitere Experimente verallgemeinert werden, da ein Einpendeln auf Normalwerte in keiner der studierten Publikationen erwähnt wurde.

In einer Studie von Sheppard et al. [88] war eine Stabilisierung des HbA1c unter PAS LAR Therapie nach Anstieg über drei Monate zu beobachten. Eine Veränderung abhängig von einer Dosiserhöhung oder Erniedrigung des PAS LAR wurde nicht festgehalten.

Ergänzend hinzuzufügen sind noch Ergebnisse aus der PAOLA- Studie [34]. Das Auftreten von Hyperglykämien oder gar Diabetes mellitus nach Gabe von LAR Präparaten war nicht dosisabhängig, vielmehr erhöhte sich das Risiko diese Nebenwirkung zu entwickeln, wenn bei Studienbeginn der Nüchternblutzuckerwert bei >100mg/dL lag. Untersuchungen der Patienten, welche an der PAOLA- Studie teilgenommen hatten, führte indes auch zu dem Ergebnis, dass auf einen schnellen und hohen Anstieg der Blutglukosekonzentration und folglich Anstieg des HbA1C ein Plateau erreicht wurde, auf welchem sich die Werte bis Studienende bewegten [27].

Octreotid kurzwirksam oder LAR führte in keiner Dosisgruppe, unabhängig vom Zeitraum, zu einer Erhöhung der Blutglukose. 10µg/kg über fünf Tage und 8mg/kg über 14 Tage erniedrigten die Glukosespiegel signifikant.

Dass Pasireotid eine Hyperglykämie bis hin zum Diabetes mellitus induzieren kann, ist hinreichend bekannt [34, 35, 76, 88]. Diese Nebenwirkung ist mit einer der wichtigsten und auch gefährlichsten, da ein manifester, schlecht eingestellter Diabetes mellitus das kardiovaskuläre Risiko enorm erhöht.

In einer zwölfmonatigen Studie aus dem Jahr 2013 (Colao- Studie, Colao A. et al.) wurden 358 Patienten in zwei Gruppen randomisiert. Alle Patienten hatten zuvor nie SSA erhalten und bekamen entweder PAS LAR 40mg oder OCT LAR 20mg alle 28 Tage. Nach drei und sieben Monaten konnte auf PAS LAR 60mg oder OCT LAR 30mg aufgestockt werden. 80.1% (PAS LAR) und 85.7% (OCT LAR) der Patienten beendeten die Studie. 28.7% der Pasireotidgruppe und 8.3% der Octreotidgruppe hatten zu Studienende erhöhte Blutglukosewerte. Es vergingen im Schnitt 84 Tage bis zum Auftreten pathologischer Glukosekonzentrationen in der Pasireotidgruppe und 196 Tage in der Octreotidgruppe. 44.4% der Patienten, welche PAS LAR erhalten hatten, mussten im Laufe der Studie Antidiabetika einnehmen. Unter Therapie mit Octreotid waren es nur 26.1% [35]. Diese Ergebnisse verdeutlichen das unterschiedliche Nebenwirkungsprofil auf den Glukosemetabolismus und könnten zudem darauf hinweisen, dass auch in unseren Versuchstieren- bei längerer Versuchsdauer- erhöhte Glukosewerte unter OCT LAR Therapie aufgetreten wären.

Die beteiligten Forscher der Colao- Studie (Colao, A. et al.) schlossen dieser nach 12 Monaten eine weitere an. Die Patienten konnten entweder in der randomisierten Gruppe bleiben, oder im 13. Monat zu PAS LAR 40mg alle 28 Tage, beziehungsweise OCT LAR 20mg alle 28 Tage wechseln. Erwähnenswert ist vor allem, dass bei Patienten, welche von PAS LAR zu OCT LAR wechselten, nach drei Monaten deutlich niedrigere bis fast normale Glukosekonzentrationen und HbA1c –Level gemessen werden konnten[36].

Somit lässt sich festhalten, dass bei täglicher Injektion von Pasireotid eine dosisabhängige Konzentrationszunahme an Glukose zu vermuten ist, während dieser Effekt bei Gabe des LAR- Präparates nach 14 Tagen nicht mehr auszumachen war. Bei Octreotid scheint diese Nebenwirkung weniger bis gar nicht ausgeprägt, sodass bei Patienten mit schon bestehendem Diabetes oder einer Neigung zu Hyperglykämie die Wahl des Präparates nicht nur von der gewünschten Wirkung auf die Hormonachse, sondern auch vom Nebenwirkungsprofil abhängig sein sollte.

Ist Pasireotid das Medikament der Wahl, sollte der behandelnde Arzt bei Anstieg der Glukose eine Zugabe von Antidiabetika in Betracht ziehen. Die Frage, auf welche Weise Pasireotid eine Hyperglykämie auslöst und welches das Medikament der ersten Wahl darstellt, ist noch nicht endgültig geklärt.

In einer Studie an gesunden Probanden von 2013, welche Pasireotid zweimal täglich in verschiedenen Dosen (600,900 und 1200µg) über sieben Tage erhielten, wurde die These einer geringeren Insulinsensitivität endgültig verworfen. Stattdessen stellten die beteiligten Wissenschaftler eine verminderte Inkretin- und konsekutiv erniedrigte Insulinsekretion fest

[89]. Schwachpunkt dieser Studie war die Durchführung in gesunden Probanden und die nicht stattgefundene Messung von GH und IGF- I, sodass die Frage, ob es einen Zusammenhang gab, noch unbeantwortet blieb.

Dass die direkte Wirkung über Bindung an Rezeptoren einen grundlegenden Mechanismus darstellt, wurde schon in Experimenten aus dem Jahr 2006 an isolierten, menschlichen Pankreaszellen in vitro demonstriert. Vor allem selektive Sstr2 Agonisten führten zu einer verminderten Insulin- und Glukagonsekretion, wobei die Rolle des Sstr5 noch nicht geklärt werden konnte[90].

2016 wurde von Schmid et al. in ihrer Publikation die Wirkung einer verminderten Insulinsekretion und nicht erhöhten Sensitivität zur Erklärung der Nebenwirkung belegt [27]. Als Grund dafür wurde die physiologische Expression von Sstr auf Alpha-(vor allem Subtyp 2) und beta- Zellen (vor allem Subtyp 5 und 2) des Pankreas [91], an welche SSA unter anderem binden, genannt. Pasireotid bindet mit hoher Affinität an Sstr5 und verringert die Insulinausschüttung, während die Glukagonausschüttung weniger beeinflusst wird. Dadurch wird ein zu hoher Blutzuckerspiegel induziert, da ohne Insulin keine Aufnahme in insulinabhängige Zellen stattfinden kann und Glukagon zusätzlich eine Erhöhung des Blutzuckers induziert.

Octreotid hingegen inhibiert über Sstr2 die Insulinausschüttung und zudem, auf Grund höherer Affinität zu Sstr2 als Pasireotid, die Glukagonausschüttung. Diese Ergebnisse komplementierten die der Studie von 2006 von Sing et al. und erklären zudem, warum Octreotid selten Hyperglykämien verursacht.

Studienteilnehmer unterschiedlicher Projekte, welche als Nebenwirkung erhöhte Blutglukosespiegel bis hin zu Diabetes mellitus erfuhren, profitierten unter anderem von der Einnahme von Metformin [35, 76, 92] dessen Wirksamkeit von Colao et al. 2015 auf dem 17. Endokrinologischen Kongress präsentiert wurde [93].

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit lief eine Phase IV Studie zur Beurteilung der Wirkung von Inkretinmimetikan im Vergleich zu Insulin bei Pasireotid- induzierter Hyperglykämie [94]. Ein ausreichend positiver Effekt dieser Medikamente würde die Therapieoptionen erweitern.

Insgesamt decken sich die Literaturdaten mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Sowohl in Ratten, als auch in Menschen induziert Pasireotid eine transiente Hyperglykämie. In den zitierten Veröffentlichungen fanden sich zudem Hinweise auf eine durch Octreotid ausgelöste Hyperglykämie, wenn auch in weniger Patienten verglichen zu Pasireotid (siehe oben). Dies konnte in

denen, dieser Arbeit zu Grunde liegenden durchgeführten Rattenexperimenten nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz beruht vermutlich auf der kurzen Versuchsdauer.

Suppression von GH und IGF- I

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, ob die Suppression von GH und IGF- I in einem quantitativen Zusammenhang stehen und ob dies von Präparat und Dosis abhängt.

Bei isolierter Betrachtung der Ergebnisse zur GH- Suppression ließ sich keine eindeutige, mathematische Korrelation von Dosis und gemessener GH- Suppression feststellen.

Bei den kurzwirksamen Präparaten zeigte die niedrigste Dosis (10µg/kg) PAS und OCT die höchste GH- Suppression bei Beurteilung der Mittelwerte, wobei sich das Ergebnis bei PAS auch durch die Signifikanz der AUC der 10µg/kg Gruppe gegenüber dem Vehikel bestätigte. Bei PAS fielen die prozentualen Werte der GH- Suppression mit höherer Dosis stetig ab (89.2%, 62.9% und 51.5%, Tabelle 12), während OCT 30µg/kg sogar einen Anstieg des GH induzierte. Welcher Mechanismus für den Anstieg verantwortlich war, war im Rahmen dieser Arbeit nicht zu klären. Da dieser auch nur bei einer Dosisgruppe auftrat, ist nicht von einem systemischen Effekt auszugehen, eventuell bedingten zufällige Schwankungen der Werte diesen beobachteten Anstieg.

Ein unterschiedliches Ansprechen bei Hypophysenadenomen auf OCT und PAS generell wurde schon sehr früh festgestellt. 2003 wurde von van der Hoek et al. die erste Studie veröffentlicht, in der zwölf Akromegaliepatienten entweder 100µg OCT, 100 PAS oder 25µg PAS kurzwirksam dreimal im Abstand von sieben Tagen erhalten hatten [75]. Sie fanden heraus, dass vor allem die Expression des Sstr entscheidend für die Ansprechrate und Suppression des GH war. OCT hat eine 2,5fach höhere Affinität für den Subtyp 2 dieses Rezeptors, sodass bei Patienten mit dominanter Sstr2 Expression der Hypophyse eine höhere Dosis PAS (250µg) gebraucht wurde, um denselben Effekt wie 100µg OCT zu bewirken. Patienten, die vermehrt Subtyp 5 exprimierten, sprachen hingegen sehr gut auf PAS an.

24 Stunden nach PAS LAR Gabe lag eine Dosisabhängigkeit zwischen 0,5mg/kg bis 8mg/kg vor. Diese zeigte sich als Abnahme der GH- Werte bei Erhöhung der Dosis, jedoch ohne zu berechnenden Zusammenhang. Die Durchschnittswerte der GH Suppression lagen bei $2,39 \pm 5,46$ ng/ml (0,5mg/kg) bis $0,2 \pm 0,12$ ng/ml (8mg/kg). Trotz zehnfacher Erhöhung von 8 auf 80mg/kg konnte diese Dosis den Wert nicht weiter senken ($0,22 \pm 0,16$ ng/ml). Dies lässt den Schluss zu,

dass 0,1mg/kg zu wenig und 80mg/kg PAS LAR zu viel für eine Anwendung über 24 Stunden sein könnten, da kein, beziehungsweise kein zusätzlicher Effekt auftrat. Da SSA an ihre Rezeptoren binden, könnte dies daran gelegen haben, dass bei 0,1mg/kg die Konzentration zu gering war, um ausreichend Rezeptoren zu besetzen. 80mg/kg hingegen führten wahrscheinlich zu einem Überschuss, sodass nach Besetzung von 100% der Rezeptoren, wie es vermutlich schon unter 8mg/kg erreicht wurde, keine weitere Wirkung auszulösen war. Um diese These zu untermauern, müssten die Konzentrationen der Medikamente im Blut im Verhältnis zur GH- Suppression gemessen werden.

Hierzu muss man jedoch sagen, dass LAR Präparate bei Menschen nicht über einen so kurzen Zeitraum angewendet werden, was die Bedeutung dieses Ergebnisses einschränkt.

Im Vergleich zu PAS LAR wurden 80mg/kg OCT LAR benötigt, um über 24 Stunden zu einer Erniedrigung des GH zu führen, wobei kein signifikanter Unterschied zur Vehikelgruppe bestand. Eine Erklärung könnte die Expression der Subtypen des Gewebes gewesen sein, wie sie schon von van der Hoek et al. [75] erläutert wurde. Wird mehr Sstr5 im Verhältnis zu Sstr2 auf den Zellen angeboten, so wird auf Grund der Affinität mehr Octreotid benötigt, um eine Wirkung zu erzielen. Demzufolge wäre eine Untersuchung der von uns entnommen Hypophysen mit Hinblick auf die Expression der Subtypen eine weitergehende Ergänzung zu dieser Arbeit.

Nach 14 Tagen war das Ergebnis ähnlich dem nach 10 Injektionen. 4mg/kg PAS LAR senkten den GH- Durchschnittswert noch um 82,8% auf $1,68 \pm 2,19\text{ng/ml}$, 4mg/kg OCT LAR senkten den Wert um 35,8% (AUC aber nicht signifikant). Erstaunlich war hierbei, dass OCT LAR 8 und 80mg/kg gar keine Wirkung mehr zeigten, während die 8 und 80mg/kg PAS LAR Gruppen prozentual zwar 4mg/kg unterlegen waren, die AUC aber noch signifikante Unterschiede im Vergleich zum Vehikel aufzeigten. Eine Wirkung wäre zumindest bei 80mg/kg OCT noch zu erwarten gewesen, da es sich hierbei um eine sehr hohe Dosis handelte.

Betrachtet man nur die Durchschnittswerte, könnte man daraus schließen, dass 4mg/kg über 14 Tage die optimale Dosis darstellten. Bei Vergleich der Graphen des rank plots der 14 Tage PAS LAR Gruppen war jedoch eine homogenere Suppression durch 80mg/kg auszumachen. Die Werte zeigten einen fast parallelen Verlauf zur X- Achse, während die 4 und 8mg/kg Gruppen extreme Bereiche von 0,7ng/ml bis hin zu 12,68ng/ml (4mg/kg) und 25,96ng/ml (8mg/kg) aufwiesen. Inwieweit diese Schwankungen bei Verwendung von PAS LAR Präparaten beim

Menschen vorkommen und ob dies den Krankheitsverlauf negativ beeinflusst, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Beide Medikamente bewirkten in unterschiedlichen Telexperimenten eine dosisabhängige Reduktion der IGF- I Konzentrationen.

10 Injektionen induzierten eine dosisabhängige Abnahme der IGF- I Konzentrationen unter PAS und OCT Therapie. PAS 50µg/kg erreichten eine signifikante Suppression um 24,8% des Ausgangswertes (1126ng/ml \pm 92,72) auf 846,3 \pm 102,1ng/ml. Die zunehmende Suppression des IGF- I in diesem Telexperiment war umgekehrt zur Zunahme der GH- Konzentrationen bei ansteigender Dosis.

Im selben Telexperiment mit OCT fielen die IGF- I Werte unter Erhöhung der Dosis ab, diese Suppression war aber mit 2% (30µg/kg) und 3,1% (50µg/kg) nur minimal ausgeprägt. Demnach war PAS OCT deutlich in der Wirksamkeit überlegen, obwohl die GH- Werte unter beiden Medikamenten, außer 30µg/kg OCT, ähnlich gut supprimiert waren.

Ein Erklärungsansatz für eine generelle verminderte Wirkung der kurzwirksamen Präparate könnte die kürzere Halbwertszeit von OCT sein. Diese wurde von Ma et al. in Akromegaliekranke mit 2,3 Stunden für OCT, und 11,8 Stunden für SOM230 (entspricht PAS), angegeben [95]. Eine längere Halbwertszeit von PAS würde zu einer Akkumulation des Medikamentes und folglich höherer Wirkung führen.

24 Stunden nach Injektion von PAS LAR zeigten sich zwei unterschiedliche Muster der IGF- I Suppression. Bei der niedrigen Dosis Gruppe war diese dosisabhängig: 0,1mg/kg supprimierten weder GH noch IGF- I, 0,5mg/kg senkten GH um 76,5% und IGF- I um 20,4%, und nach 1,0mg/kg war GH um 94,7% und IGF- I um 40,4% gefallen.

Ab 4mg/kg PAS LAR 24 Stunden nach Injektion fiel die Suppression des IGF- I (68,5%, 66,5%, 64,7%) mit ansteigenden GH- Werten, ähnlich wie nach 10 Injektionen. Es muss der Vollständigkeit halber angemerkt werden, dass bei 80mg/kg die Suppression des GH 1,7% niedriger als die durch 8mg/kg hervorgerufene Erniedrigung war. Dies könnte auf der geringen Sensitivität des ELISA für Werte kleiner 0,7ng/ml liegen, da bei Betrachtung der Einzelwerte mehr als doppelt so viele Werte mit 0,7ng/ml nach 80mg/kg PAS LAR angegeben wurden, als nach 8mg/kg. Die exakte Berechnung war demnach nicht möglich.

24 Stunden nach OCT LAR Gabe stieg die IGF- I Suppression abhängig von der Dosis. Die Vehikelgruppe hatte einen Durchschnittswert von 1574 \pm 177,3ng/ml und sank auf 1466 \pm

331,7ng/ml (4mg/kg, minus 7%), $1311 \pm 134,3$ ng/ml (8mg/kg, minus 16,7%) und $1157 \pm 105,4$ ng/ml (80mg/kg, minus 26,5%). Wiedermal stand diese Senkung nicht im Zusammenhang mit der beobachteten GH- Suppression, da 4 und 8mg/kg OCT LAR die Durchschnittswerte anhoben.

14 Tage nach Gabe der LAR- Präparate war die Dosisabhängigkeit bei PAS LAR noch ausgeprägt (27,7%, 43%, 67,4% mit ansteigender Dosis), bei OCT- LAR war sie nicht mehr nachvollziehbar.

Auch in diesem Teilexperiment war PAS als LAR- Form OCT- LAR überlegen. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem aus der schon erläuterten Colao- Studie (siehe Wirkung der Medikamente auf den Glukosehaushalt), die einen Direktvergleich von PAS und OCT- LAR über 12 Monate in 358 Akromegaliepatienten (unkontrollierte Aktivität der Krankheit oder nach Operation) durchführten. Das Erlangen biochemischer Kontrolle war Ziel der Experimente mit Konzentrationen von GH < 2,5 µg/L und normalen IGF- I Werten, angepasst an Geschlecht und Alter. Von den 80,1% (PAS- Gruppe) und 85,7% (OCT- Gruppe) die die Studie beendeten, erreichten 31,3% aller PAS LAR Patienten und nur 19,2% aller OCT LAR Patienten dieses Ziel nach 12 Monaten. Isolierte Betrachtung von GH und IGF- I zeigte Erfolg hinsichtlich der gesetzten Parameter in 48,3% und 51,6% (GH, PAS LAR versus OCT LAR), sowie in 38,6% und 23,6% (IGF- I, PAS LAR versus OCT LAR) [35]. Größter Schwachpunkt dieser Studie war, dass kein Unterschied zwischen Patienten gemacht wurde, welche die Startdosis beibehalten und jenen, die die Dosis veränderten hatten. Dies macht eine Aussage über die Dosisabhängigkeit unmöglich.

Letztendlich brachte eine, die Colao-Studie als Grundstein nehmende Studie von Bronstein et al. den Beweis für die höhere Effektivität Pasireotids. Die Patienten, welche in einem oder beiden Parametern nicht das Ziel erreicht hatten, konnten unter bestimmten Bedingungen (siehe Studiendesign) zu PAS LAR 40mg alle 28 Tage, oder OCT LAR 20mg wechseln. Auch während der Folgestudie war eine Erhöhung der Dosis nach insgesamt 17 oder 20 Monaten möglich. Von den 81 Patienten, die zu PAS LAR gewechselt hatten und in welchen vorher unter OCT LAR keine Einstellung von GH und IGF- I erreicht werden konnte, waren 17,3 % am Ende mit beiden Parametern im Zielbereich. Insgesamt zeigten 27,2% normale IGF- I Werte und 44% GH- Konzentrationen kleiner 2,5µg/L [36].

Schlussendlich war im Rahmen der von uns durchgeführten Experimente kein quantitativer Zusammenhang zwischen GH-, und IGF- I Suppression feststellbar. Die prozentuale IGF- I Erniedrigung war in einigen Gruppen dosisabhängig (PAS, OCT, PAS LAR niedrige Dosis, OCT LAR 24h und PAS LAR 14d), während die GH- Suppression vermehrt von verwendetem Medikament, Wirkungsdauer (kurzwirksam versus LAR) und der Versuchsdauer abhing. Auf

Grund dessen muss ein GH- unabhängiger Wirkmechanismus für die IGF- I Suppression in Betracht gezogen werden, da sich die IGF- I Suppression nicht alleine durch die GH- Erniedrigung erklären ließ (siehe unten).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konzentration der Medikamente nach den unterschiedlichen Dosisexperimenten im Plasma der Tiere nicht gemessen. Diese Information hätte es erlaubt, eine Aussage über die Potenz der jeweiligen Dosis zu treffen und wäre eine wertvolle Ergänzung gewesen, da ein noch besserer Vergleich der Ergebnisse der Teilerperimente möglich gewesen wäre.

Ist eine medikamentenabhängige Veränderung der hepatischen Expression der Gene des IGF- I, GH- Rezeptors und IGF- I binding protein 3 nachweisbar?

Die Vermutung, dass noch ein weiterer Wirkmechanismus als der auf die Hypophyse vorliegt, wurde schon in mehreren Publikationen geäußert [96-98] und brachte die Frage auf, wo die Medikamente noch ansetzen könnten.

Eine direkte oder indirekte hepatische Wirkung scheint naheliegend, da ein Großteil des zirkulierenden IGF- I in der Leber synthetisiert und von dort ins Blut ausgeschüttet wird [99]. Dies wird durch GH induziert, welches an den von der Leber exprimierten Rezeptor (GHR) andockt und eine Signalkaskade auslöst, die in der Sekretion von IGF- I endet. Auch das Bindungsprotein, das IGF- I zum großen Teil im Blut bindet und transportiert (IGFBP- 3), wird unter anderem durch hepatisches Gewebe produziert [100]. IGFBP- 3 fungiert als Regulator des IGF- I. Dabei kann es die Wirkung des IGF- I potenzieren oder jedoch inhibieren, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind [4, 101].

Jeder Ratte aus den verschiedenen LAR- Gruppen wurde post mortem hepatisches Gewebe entnommen, um es auf die relative Expression der Gene für IGF- I, GH- Rezeptor und IGFBP- 3 zu untersuchen.

24 Stunden nach PAS LAR Gabe waren die relative IGF- I und IGFBP-3 Expression in allen Gruppen signifikant erniedrigt. Da in allen Tieren auch GH signifikant supprimiert war, stand dieses Ergebnis im Kontext mit dem aktuellen Verständnis der GH/IGF- I Achse. In knockout Mäusen, welche keine hepatischen GHR besaßen, wurden im neunten Lebensmonat stark erniedrigte IGF- I mRNA Level mit einer Erniedrigung um 93% (männliche Mäuse) und 82%

(weibliche Mäuse) im Vergleich zur Vehikelgruppe gemessen. Auch das zirkulierende IGF- I, ebenso wie zirkulierendes IGFBP-3 waren in der Studie signifikant reduziert [99].

Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass kein oder wenig GH dieselbe Folge haben sollte, da die relative Expression von IGF- I von der Bindung des GH an seinen Rezeptor abzuhängen scheint. In genannter Studie wurde IGFBP- 3 nur im Serum gemessen, sodass ein Vergleich mit unseren IGFBP-3 RNA- Ergebnissen ausblieb.

Ein Vergleich war jedoch mit Ergebnissen einer anderen Studie möglich, mit welcher unsere Ergebnisse sich deckten.

In der Studie von Albiston et al. [100] wurde in weiblichen Ratten nach Entfernung der Hypophyse ein Rückgang der hepatischen IGF- I und IGFBP-3 mRNA um 90 und 50% gemessen. Die Behandlung dieser Tiere mit 60µg GH pro Tag erhöhte die Expression beider Parameter, sodass von einer GH- abhängigen Expression des IGF- I und IGFBP-3 ausgegangen werden konnte.

In den behandelten Tieren war 24 Stunden nach PAS LAR Gabe zudem die relative GH- Rezeptor Expression in der Leber vermindert. Im Vergleich mit der IGF- I und IGFBP-3 RNA war die relative Erniedrigung jedoch weniger stark ausgeprägt. Auffallend war, dass die erreichte Suppression der GH- Serumwerte von 1,7% (8mg/kg) auf 1,87% (80mg/kg) im Vergleich zum Serumwert der Vehikelgruppe (entspricht 100%, siehe Tabelle 17) minimal absank und sich auch in der relativen Expression des GHR darstellte. Die relative Expression stieg von 0,7998 (8mg/kg) auf 0,8148 (80mg/kg). Dieses Ergebnis verleitet dazu, eine Wechselwirkung zwischen dem Anstieg des Serum- GH und dem Anstieg der Expression des GHR anzunehmen. Dieser Zusammenhang wurde nach 14 Tagen Behandlungsdauer jedoch nicht bestätigt.

14 Tage nach PAS LAR waren dosisabhängige, signifikante Abstufungen der relativen hepatischen Expression des IGF- I zu sehen. Die GH Konzentrationen im Serum waren nicht dosisabhängig supprimiert. Eventuell könnte jedoch die homogene Verteilung der Werte unter 80mg/kg einen positiven Effekt gehabt haben, indem die Suppression des GH auf ein konstant niedriges Level eine ausgeprägte Wirkung auf die IGF- I RNA Expression hatte.

Interessanterweise war die Dosisabhängigkeit aber auch bei der relativen Expression des GHR nachzuvollziehen. Hierbei ist ein Einfluss der GH- Rezeptorerniedrigung auf die IGF- I- Konzentration anzunehmen. In einer Studie von List et al. an männlichen und weiblichen Mäusen mit einem knockout des hepatischen GHR (LiGHRKO Mäuse) war bei stark erhöhten zirkulierenden GH- Konzentrationen die relative mRNA Expression für IGF- I stark erniedrigt. Auf Grund des

Wegfalls der negativen Rückkopplung stieg der Serumwert des GH geschlechterunabhängig um 300%. IGF- I hingegen nahm in den weiblichen Mäusen um 87%, in männlichen um 91% ab [99].

Ob die Dosisabhängigkeit des Effektes des Somatostatinanalogs auf den GHR die der IGF- I Expressionslevel bedingte, bleibt spekulativ. Ebenso ist der Wirkmechanismus, welcher die GHR- Expression reduzierte, unbekannt. Auf Grund der Dosisabhängigkeit ist jedoch eine direkte hepatische Wirkung des Pasireotids nicht auszuschließen. Sollte Pasireotid die Expression des GHR auf hepatischer Ebene beeinflussen, würde dies auch die Überlegenheit des Medikamentes erklären. Die enorme IGF- I Suppression wäre nicht nur durch Senkung der GH- Sekretion auf hypophysärer Ebene, sondern auch durch das verminderte Angebot des Rezeptors für GH erklärbar. Ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien zu dieser These war bei Fertigstellung der Arbeit nicht möglich, da keine Studie zur Untersuchung dieses Zusammenhanges gefunden wurde.

Die hepatische Expression von IGFBP-3 stieg nach 4mg/kg PAS LAR über 14 Tage an. 80mg/kg führten hingegen zu einer statistisch signifikanten Abnahme des Expressionslevels. Eine Erklärung für den Anstieg nach 4mg/kg PAS LAR fand sich nicht, da kein Zusammenhang zur Suppression von GH vorlag und kein anderer gemessener Parameter diese Zunahme zeigte. Da IGFBP-3 nicht im Serum gemessen worden war, konnte zwischen hepatischer Expression und tatsächlichem Serumwert kein Zusammenhang hergestellt werden. Dies wäre eine sinnvolle Ergänzung gewesen, da sowohl Albiston et al. im Rattenmodell [100], als auch Li et al. im Schweinmodell [102] keine Korrelation zwischen hepatischer IGFBP-3 Expression und den gemessenen Serumwerten fanden. Folglich wäre im Serum eventuell eine dosisabhängige Erniedrigung feststellbar gewesen.

24 Stunden nach OCT LAR war sowohl die hepatische Expression von IGF- I, als auch die von IGFBP- 3 und GH- Rezeptor nach 4mg/kg erhöht. IGF- I und IGFBP-3 fielen dann mit zunehmender Dosis ab. Dieses Muster spiegelte die gemessenen GH- Konzentrationen wider. GHR hingegen zeigte nach 80mg/kg OCT LAR einen leichten Anstieg der Expressionslevel, sodass eine Korrelation zwischen GH im Serum und dem hepatischen Rezeptor nicht gegeben war.

14 Tage nach OCT LAR Injektion waren keine signifikanten Ergebnisse nachzuweisen. Da auch IGF- I und GH im Serum ähnliche Konzentrationen wie ihre jeweilige Vergleichsgruppe

aufwiesen und eine noch anhaltende Wirksamkeit des Medikamentes angezweifelt werden konnte, standen die Ergebnisse der hepatischen Expression damit in Einklang.

Im Rahmen dieser Arbeit blieben einige Fragen unbeantwortet, so zum Beispiel der Grund für die geringere Expression des GHR in der Leber der mit PAS LAR über 14 Tage behandelten Tiere. Bei Pasireotid LAR nach 24 Stunden schien eine Korrelation des Serum- GH und der relativen Expression des GHR vorzuliegen. Eine Abnahme des Rezeptors auf Grund eines geringeren Angebots des Liganden war anzunehmen, auch wenn physiologischer Weise generell eine Abnahme eines Liganden in den meisten Fällen eine Überexprimierung des Rezeptors bedingt. Nicht vergessen werden darf jedoch, dass die tatsächliche Dichte an Rezeptoren auf den Zellen nicht gemessen oder nachgewiesen wurde.

14 Tage nach Injektion war die hepatische Expression aller drei Parameter zwar zum großen Teil dosisabhängig, aber nicht mehr in einen direkten Zusammenhang zu den gemessenen GH-Werten zu stellen. Eine alleinige Wirkung des zirkulierenden GH auf die Expression des Rezeptors erschien zunehmend unwahrscheinlicher.

Auf Grund der vorgestellten Ergebnisse drängte sich immer mehr die Frage einer direkten, GH-unabhängigen hepatischen Wirkung des Pasireotids auf, welche unter anderem die Expression des GHR beeinflusst haben könnte.

Murray et al. versuchten 2004 eine ähnliche Frage zu beantworten. An Hand aus Ratten isolierter Hepatozyten und entnommenen Lebern untersuchten sie die zentrale und periphere Wirkung und Wirkungsweise von Somatostatin und OCT. Zuerst wiesen sie mit Hilfe einer PCR Sstr2 und 3 im hepatischen Rattengewebe nach, die Grundlage für eine mögliche Bindung von Somatostatin. Die Hepatozyten wurden für 1 Stunde mit 100nM Somatostatin oder OCT behandelt, bevor 100 oder 500ng/ml GH hinzugefügt und sie für 24 Stunden inkubiert wurden. Die Transkription der IGF- I mRNA war in beiden Gruppen erniedrigt. Zudem führten 500ng/ml GH zu einem Anstieg der IGF- I Produktion der Hepatozyten um 60% in 24 Stunden. Bei Vorbehandlung der Zellen mit Somatostatin und Octreotid wurde dieser Anstieg auf 32, beziehungsweise 40% begrenzt, sodass Murray et al. zu dem Schluss kamen, dass vor allem Somatostatin nicht nur an der Hypophyse, sondern auch peripher wirkt. Die limitierte Erhöhung war unter Octreotid mit $p=0,01$ nicht signifikant. Durch weitere Versuche an isolierten Zellen und ganzen Lebern kamen sie auch zu dem Ergebnis, dass Somatostatin nur die durch GH induzierte IGF- I Produktion hemmen konnte. Ohne das Vorhandensein von GH war keine Wirkung auf IGF- I im Vergleich zur Vehikelgruppe nachweisbar. Außerdem senkten Somatostatin und Octreotid die Bindung von radioaktiv markiertem I^{125} - GH an seinen Rezeptor um 68 und 81%. Eine peri-

phere Wirkung war folglich nachgewiesen[98]. In der Studie wurde Pasireotid nicht getestet, da es sich aber auch um ein SAA handelt, kann von einer ähnlichen peripheren Wirkung ausgegangen werden.

Letztendlich konnte die Frage einer peripheren Wirkung des Pasireotids an Hand unserer Ergebnisse jedoch nicht endgültig beantwortet werden.

5 Zusammenfassung

Auf Grund der oft späten Diagnose der Akromegalie und der mit dieser Krankheit einhergehenden Komorbiditäten, welche nicht nur die Lebensqualität einschränken, sondern auch die Lebenserwartung verkürzen, ist eine optimale Behandlung von großer Bedeutung. Neben der primär chirurgischen Intervention ist meist eine medikamentöse Weiterbehandlung nötig. Die bereits in der Klinik verwendeten Somatostatinanaloga Octreotid und Pasireotid zeigen gute Wirksamkeit im Hinblick auf die Einstellung GH und IGF- I in physiologische Zielbereiche. Für Pasireotid wird neben der zentralen Wirksamkeit zudem eine periphere Wirkung diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Octreotid mit Pasireotid verglichen. Das Augenmerk lag zum einem auf dem individuellen Nebenwirkungsprofil, da für Pasireotid Hyperglykämien beschrieben wurden. Eine Abhängigkeit der induzierten Hyperglykämie von der Dosis und Darreichungsform und ein Vergleich mit den Octreotidgruppen wurden untersucht. Außerdem waren Veränderungen der Körper-, und der Lebergewichte, sowie Veränderungen der perirenal und epididymalen Fettpolster Teil der Untersuchungen. Mittels Genexpressionsstudien wurde die hepatische Expression von IGF- I, des GH- Rezeptors und IGF binding protein-3 unter Therapie mit Octreotid oder Pasireotid untersucht. Zum anderen lag der Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung der Suppression von GH und IGF- I. Insbesondere die Frage nach einem prozentualen Verhältnis der erreichten Suppression von GH und IGF- I durch Octreotid und Pasireotid sollte in dieser Studie beantwortet werden.

Gesunde, sechs Wochen alte, männliche Lewis Ratten wurden in zwei Teilexperimente aufgeteilt. Alle Tiere eines Teilexperimentes bekamen das gleiche Präparat (Octreotid oder Pasireotid) in kurzwirksamer oder langwirksamer Formulierung gewichtsadaptiert subkutan injiziert. Die Formulierungen wurden in unterschiedlichen Dosen appliziert, wobei jede Untergruppen aus sechs Tieren bestand. Das jeweilige kurzwirksame Präparat wurde einmalig oder konsekutiv über fünf Tage in den Dosen 10,30 oder 50 µg/kg injiziert. Das langwirksame Präparat wurde in den Dosen 4,8 oder 80 mg/kg einmalig verabreicht und die Tiere nach 24 Stunden oder 14 Tagen untersucht. Auf Grund der pulsilen Ausschüttung von GH wurden serielle Blutentnahmen zur Untersuchung der GH-Sekretion durchgeführt. IGF- I wurde in allen Gruppen in der letzten abgenommenen Blutprobe im Serum gemessen.

Es war zu beobachten, dass bereits 24 Stunden nach Pasireotid LAR das Lebergewicht in allen Gruppen signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe ($9,4 \pm 0,7$ g (Vehikel), $7,2 \pm 0,4$ g (4mg/kg), $7,5 \pm 0,6$ g (8mg/kg) $8,0 \pm 0,7$ g (80mg/kg)), ansonsten aber keine Auswirkungen auf

das Körpergewicht oder die Fettdepots auffindbar waren. Über 14 Tage zeigte sich nach Pasireotid LAR jedoch, dass sowohl die Zunahme des Körper-, und Lebergewichts, als auch der Aufbau des epididymalen Fettpolsters unter dem Vergleichswert der Vehikelgruppe blieben. Diese Effekte waren unter Octreotid LAR Therapie nicht detektierbar.

Kurzwirksame und langwirksame Pasireotidpräparate führten zu einer signifikanten Erhöhung der Blutglukose während Octreotid diese in den Behandlungsgruppen unbeeinflusst ließ, beziehungsweise tendenziell reduzierte. Ein dosisabhängiger Anstieg der Blutglukose gegenüber der jeweiligen Vehikelgruppe konnte nach 10 Injektionen des kurzwirksamen, und 24 Stunden nach Injektion des langwirksamen Pasireotid beobachtet werden. Die höchsten Blutglukosewerte wurden nach 10 Injektionen von 50µg/kg des kurzwirksamen Pasireotid mit 156,7±25,0mg/dl (Vehikelgruppe 114,5±13,8mg/dl, $p=0,0045$) und 24 Stunden nach einmaliger Injektion von 80mg/kg des langwirksamen Pasireotid LAR (146,8±13,2mg/dl, Vehikelgruppe 123,7±8,6mg/dl, $p=0,0372$) gemessen.

In den Genexpressionsanalysen wurden signifikante Veränderungen gegenüber der jeweiligen Vehikelgruppe nur in den Pasireotid LAR Gruppen beobachtet. In allen Dosisgruppen (4,8 und 80mg/kg) wurde eine signifikant erniedrigte hepatische Expression von IGF- I und IGF binding protein-3 nach 24 Stunden detektiert; nach 14 Tagen waren IGF- I und der GH-Rezeptor nach 4,8, und 80mg/kg, IGFBP-3 jedoch nur nach 80mg/kg signifikant reduziert.

Schlussendlich führten beide Pasireotid- Präparate in allen Dosen oberhalb von 0,1mg/kg zu einer deutlichen Suppression von GH und IGF- I. So war GH 24 Stunden nach Injektion von 80mg/kg Pasireotid LAR um 98,1% im Vergleich zur in der Vehikelgruppe gemessenen Konzentration supprimiert, IGF- I auf 35,3% des Referenzwertes der Vehikelgruppe. 14 Tage nach einmaliger Injektion von 80mg/kg Pasireotid LAR war GH im Serum der Tiere noch auf 23,1 %, IGF- I auf 32,6% der Werte der Vehikelgruppe supprimiert. Im Gegensatz dazu war GH 24 Stunden nach Octreotid LAR in der 4mg/kg und 8mg/kg-Gruppe erhöht, was auf unzureichende Dosierung schließen lässt. 80mg/kg Octreotid LAR suppressierte GH jedoch auf 26,2% der Kontrolltiere. 14 Tage nach Injektion der verschiedenen Octreotid LAR Dosen war keine signifikante Wirkung auf die zirkulierenden GH und IGF- I Konzentrationen mehr nachzuweisen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Pasireotid, unabhängig von Formulierung und Versuchsdauer, potenter als Octreotid zu einer Suppression von GH und IGF- I führte. Die einzige Ausnahme bildete PAS LAR 0,1mg/kg, welches vermutlich eine zu geringe Dosis darstellte, um einen effektiven Einfluss auszuüben. Im Gegensatz zu Octreotid scheint Pasireotid die IGF- I Sekretion über einen dualen Mechanismus zu reduzieren, da es neben der Suppression der hypophysären GH-Sekretion auch die hepatische Expression des GH-Rezeptors

unter Behandlung reduziert. Dies sollte zu einem verminderten Ansprechen der Hepatozyten auf GH führen, was die Wirkung des Medikamentes zusätzlich verstärken würde. Nachdem der Mechanismus der Reduktion des GHR unbekannt ist, sollte dieses Phänomen in weiteren Studien untersucht werden. Zudem wäre eine Durchführung der Versuche in weiblichen Ratten und in einem Tiermodell mit pathologischerhöhten GH-Konzentrationen anzustreben, um die Aussagekraft im Hinblick auf Geschlechterunterschiede, aber auch bei tatsächlicher Erkrankung mit pathologischen GH-Konzentrationen, zu erhöhen.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verschiedenen Pasireotidgruppen mit langwirksamen Präparaten (LAR) und kurzwirksamer Variante.	17
Tabelle 2: Liste der verschiedenen Octreotidgruppen mit langwirksamen Präparaten (LAR) und kurzwirksamer Variante.	17
Tabelle 3: PAS- LAR Dosisgruppen.	18
Tabelle 4: PAS- LAR niedrige Dosisgruppen.	18
Tabelle 5: PAS kurzwirksam Dosisgruppen.	19
Tabelle 6: OCT- LAR Dosisgruppen.	19
Tabelle 7: OCT kurzwirksam Dosisgruppen.	20
Tabelle 8: Zyklusschritte.	27
Tabelle 9: Gewicht perirenale Fettdepots 24h nach Injektion des niedrig dosierten Pasireotid-LAR .	45
Tabelle 10: Körpergewichte 14 Tage nach Pasireotid-LAR Injektion.	49
Tabelle 11: Suppression IGF- I nach PAS Injektion.	62
Tabelle 12: Suppression GH nach PAS Injektion.	63
Tabelle 13: Suppression IGF- I nach OCT Injektion.	64
Tabelle 14: Suppression GH nach OCT Injektion.	66
Tabelle 15: Suppression IGF- I 24h nach PAS LAR Injektion.	67
Tabelle 16: Suppression IGF- I 24h nach PAS LAR niedrige Dosis Injektion.	68
Tabelle 17: Suppression GH 24h nach PAS LAR Injektion.	70
Tabelle 18: Suppression GH 24h nach PAS LAR niedrige Dosis Injektion.	70
Tabelle 19: Suppression IGF- I 24h nach OCT LAR Injektion.	72
Tabelle 20: Suppression GH 24h nach OCT LAR Injektion.	74
Tabelle 21: Suppression IGF- I 14d nach PAS LAR Injektion.	75
Tabelle 22: Suppression GH 14d nach PAS LAR Injektion.	76
Tabelle 23: Suppression IGF- I 14d nach OCT LAR Injektion.	77
Tabelle 24: Suppression GH 14 Tage nach OCT LAR Injektion.	79

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stark vereinfachtes Schema der Hypothalamus- Hypophysen- Achse bezogen auf das Wachstumshormon.	2
Abbildung 2: Aufteilung der Ratten in die unterschiedlichen Behandlungsgruppen.	16
Abbildung 3: 96 well Platte.	27
Abbildung 4: Struktur eines Primers.	28
Abbildung 5: Fotografie der Gelelektrophorese.	29
Abbildung 6: Pippetierschema beispielhaft. P steht für Probe (cDNA- Probe), die Zahlen identifizieren gleiche Proben.	31
Abbildung 7: Körpergewichte der 1 und 10 Injektionen Gruppen.	35
Abbildung 8: Körpergewichte fünf Tage Gruppen unter kurzwirksamem Pasireotid.	36
Abbildung 9: Lebergewicht der 1 und 10 Injektionen PAS Gruppen.	36
Abbildung 10: Gewicht perirenales Fettpolster nach 1 und 10 Injektionen.	37
Abbildung 11: Gewicht epididymales Fettpolster der kurzwirksamen PAS Gruppen.	38
Abbildung 12: Körpergewichte nach einer bzw. 10 Injektionen.	39
Abbildung 13: Körpergewichte fünf Tage Gruppen unter kurzwirksamem Octreotid.	39
Abbildung 14: Lebergewicht der kurz-wirksamen OCT Gruppen.	40
Abbildung 15: Gewicht perirenales Fettpolster der kurzwirksamen OCT Gruppen.	41
Abbildung 16: Gewicht epididymales Fettpolster der kurzwirksamen OCT Gruppen.	41
Abbildung 17: Körpergewicht Pasireotid-LAR 24h nach Injektion.	42
Abbildung 18: Körpergewicht Pasireotid-LAR niedrige Dosis 24h nach Injektion.	43
Abbildung 19: Lebergewichte Pasireotid-LAR 24h nach Injektion.	43
Abbildung 20: Lebergewichte Pasireotid-LAR niedrige Dosis 24h nach Injektion.	44
Abbildung 21: Gewicht perirenale Fettdepots Pasireotid-LAR 24h nach Injektion.	45
Abbildung 22: perirenale Fettdepots 24h nach Injektion niedrig dosiertes Pasireotid- LAR.	46
Abbildung 23: epididymale Fettdepots Pasireotid-LAR (links) und niedrige Dosis (rechts) 24h nach Injektion.	46
Abbildung 24: Körpergewicht OCT LAR 24h.	47
Abbildung 25: Lebergewicht OCT LAR 24h.	48

Abbildung 26: perirenales Fettdepot OCT LAR 24h.	48
Abbildung 27: Gewicht epididymale Fettdepots 24h nach OCT LAR Injektion.	49
Abbildung 28: Körpergewicht PAS LAR 14d.	50
Abbildung 29: Körpergewicht Zunahme über 14d nach PAS LAR Injektion.	50
Abbildung 30: Lebergewichte 14d nach PAS LAR Injektion.	51
Abbildung 31: perirenale Fettdepots 14d nach PAS LAR Injektion.	51
Abbildung 32: epididymale Fettdepots 14d nach PAS LAR Injektion.	52
Abbildung 33: Körpergewicht 14d nach PAS LAR Injektion.	53
Abbildung 34: Körpergewicht Zunahme über 14d nach OCT LAR Injektion.	53
Abbildung 35: Lebergewichte 14d nach PAS LAR Injektion.	54
Abbildung 36: perirenale Fettdepots 14d nach PAS LAR Injektion.	55
Abbildung 37: epididymales Fettdepots 14d nach PAS LAR Injektion.	55
Abbildung 38: Glukose im Vollblut nach ein-, oder zehnmaliger Injektion von Pasireotid.	56
Abbildung 39: Glukose im Vollblut nach ein-, oder zehnmaliger Injektion von Octreotid.	57
Abbildung 40: Glukose im Vollblut 24 Stunden nach PAS-LAR Injektion.	58
Abbildung 41: Glukose im Vollblut 24 Stunden nach PAS-LAR niedrige Dosis Injektion.	58
Abbildung 42: Glukose im Vollblut 24 Stunden nach OCT-LAR Injektion.	59
Abbildung 43: Glukose im Vollblut 14 Tage nach PAS-LAR Injektion.	60
Abbildung 44: Glukose im Vollblut 14 Tage nach OCT-LAR Injektion.	60
Abbildung 45: IGF- I nach ein-, und zehnmaliger PAS Injektion.	61
Abbildung 46: Wachstumshormonkonzentrationen nach ein-, und zehnmaliger PAS Injektion.	63
Abbildung 47: IGF- I nach ein-, und zehnmaliger OCT Injektion.	64
Abbildung 48: Wachstumshormonkonzentrationen nach ein-, und zehnmaliger OCT Injektion.	65
Abbildung 49: IGF- I 24h nach PAS LAR Injektion.	66
Abbildung 50: IGF- I 24h nach PAS LAR niedrige Dosis Injektion.	68
Abbildung 51: Wachstumshormonkonzentrationen 24h nach PAS LAR Injektion.	69
Abbildung 52: Boxplot GH 24h nach PAS LAR Injektion.	71

Abbildung 53: IGF- I 24h nach OCT LAR Injektion.	72
Abbildung 55: Boxplot GH 24h nach OCT LAR Injektion.	73
Abbildung 54: Wachstumshormonkonzentrationen 24h nach OCT LAR Injektion.	73
Abbildung 56: IGF- I 14d nach PAS LAR Injektion.	75
Abbildung 57: Wachstumshormonkonzentrationen 14 Tage nach PAS LAR Injektion.	76
Abbildung 58: Boxplot GH 14 Tage nach PAS LAR Injektion.	76
Abbildung 59: IGF- I 14 Tage nach OCT LAR Injektion.	77
Abbildung 61: Boxplot GH 14d nach OCT LAR Injektion.	78
Abbildung 60: Wachstumshormonkonzentrationen 14d nach OCT LAR Injektion.	78
Abbildung 62: Hepatische Expression von IGF- I 24 Stunden nach PAS LAR Injektion.	80
Abbildung 63: hepatische Expression des GH Rezeptors 24 Stunden nach PAS LAR Injektion.	80
Abbildung 64: hepatische Expression von IGFBP-3 24h nach PAS LAR Injektion.	81
Abbildung 65: hepatische Expression von IGF- I 24 Stunden nach OCT LAR Injektion.	82
Abbildung 66: hepatische Expression des GH Rezeptors 24h nach OCT LAR Injektion.	82
Abbildung 67: hepatische Expression des IGFBP-3 24 Stunden nach OCT LAR Injektion.	83
Abbildung 68: hepatische Expression von IGF- I 14 Tage nach PAS LAR Injektion.	84
Abbildung 69: hepatische Expression des GH Rezeptors 14 Tage nach PAS LAR Injektion.	84
Abbildung 70: hepatische Expression des IGFBP-3 14 Tage nach PAS LAR Injektion.	85
Abbildung 71: hepatische Expression von IGF- I 14 Tage nach OCT LAR Injektion.	86
Abbildung 72: hepatische Expression des GH Rezeptors 14 Tage nach OCT LAR Injektion.	86
Abbildung 73: hepatische Expression von IGFBP-3 14 Tage nach OCT LAR Injektion.	87

8 Literaturverzeichnis

1. Marie, P., *Von zwei Fällen Akromegalie. Singuläre, nicht angeborene Hypertrophie der oberen und unteren Extremitäten und des Kopfes.* *Révue Médicale Française* 1886. **6**: p. 297–333.
2. Herold, G.u.M., in *Innere Medizin*. 2013. p. 794- 795.
3. Sowmya, S., Symons, K., Rothman, E., Barkan, A. L., *Complex Rhythmicity of Growth Hormone secretion in humans.* *Pituitary*, 2006. **9**(2): p. 121-125.
4. Firth, S.M., Baxter, R.C., *Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins.* *Endocrine Reviews*, 2002. **23**(6): p. 824-854.
5. Clemmons, D.R., MD *Physiology of insulin-like growth factor I.* 2014.
6. Møller, N., Jørgensen, J. , *Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects.* *Endocrine Reviews*, 2009. **30**(2): p. 152-177.
7. Ribeiro-Oliveira, A., Jr Militão Abrantes, M., Barkan, A.L., *Complex Rhythmicity and Age Dependence of Growth Hormone Secretion Are Preserved in Patients With Acromegaly: Further Evidence for a Present Hypothalamic Control of Pituitary Somatotropinomas.* *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013. **98**(7): p. 2959–2966.
8. Reid, T.J., Post, K.D., Bruce, J.N., Kanibir, M.N., Reyes-Vidal, C.M., Freda, P.U., *Features at diagnosis of 324 patients with acromegaly did not change from 1981 to 2006; Acromegaly remains under-recognized and under-diagnosed.* *Clinical Endocrinology*, 2010. **72**(2): p. 203-208.
9. Lugo, G., Pena, L., Cordido, F., *Clinical Manifestations and Diagnosis of Acromegaly.* *International Journal of Endocrinology*, 2012. **2012**.
10. Valea, A., Carsote, M., Ghervan, C., Georgescu, C., *Glycemic profile in patients with acromegaly treated with somatostatin analogue.* *Journal of Medicine and Life*, 2015(8(Spec Issue)): p. 82–86.
11. Butler, A., A and D. Le Roith, *Control of growth by the somatotrophic axis: Growth hormone and the insulin-like growth factor have related and independet roles.* *Annual review of Physiology*, 2001. **63**: p. 141-164.
12. Turner, R.C., Millns, H., Neil, H.A.W., Stratton, I.M., Manley, S.E., Matthews, D.R., Holman, R.R. , *Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent*

-
- diabetes mellitus: United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS: 23)*. British Medical Journal, 1998. **316**(7134): p. 823-828.
13. Dekkers, O.M., Biermasz, N. R., Pereira, A. M., Romijn, J. A., Vandenbroucke, J. P. , *Mortality in Acromegaly: A Metaanalysis*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **93**(1): p. 61-67.
 14. Holdaway, I.M., Bolland, M.J., Gamble, G.D., *A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly*. European Journal of Endocrinology, 2008. **159**(2): p. 89-95.
 15. Bogazzi, F., Colao, A., Rossi, G., Lombardi, M., Urbani, C., Sardella, C., Iannelli, A., Scattina, I., Manetti, L., Del Sarto, S., Pivonello, R., Grasso, L., Lupi, I., Auriemma, R., Lombardi, G., Martino, E., *Comparison of the effects of primary somatostatin analogue therapy and pituitary adenectomy on survival in patients with acromegaly: a retrospective cohort study*. European journal of endocrinology, 2013. **169**: p. 367-376.
 16. Freda, P.U., *Current concepts in the biochemical assessment of the patient with acromegaly*. Growth hormone and IGF research, 2003. **13**(4): p. 171-184.
 17. Andersen, M., *MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: GH excess: diagnosis and medical therapy*. European journal of endocrinology, 2014. **170**: p. R31-41.
 18. Fleseriu, M., MD, Jr Delashaw, J.B., MD, Cook, D.M., MD, *Acromegaly: a review of current medical therapy and new drugs on the horizon*. Journal of Neurosurgery, 2012. **29**(4): p. E15.
 19. Buchfelder, M., Feulner, J., *Neurosurgical Treatment of Acromegaly*. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2016. **138**: p. 115-139.
 20. Melmed, S., Colao, A., Barkan, A., Molitch, A., Grossmann, A.B., Kleinberg, D., Clemmons, D., Chanson, P., Laws, E., Schlechte, J., Vance, M. L., Ho, K., Giustina, A., *Guidelines for Acromegaly Management: An Update*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. **94**(5): p. 1509-1517.
 21. Hazer, D.B., MD , Isik, S., MD, Berker, D., MD, Güler, S. MD, Gürlek, A., MD, Yücel, T., MD, Berker, M., MD, *Treatment of acromegaly by endoscopic transsphenoidal surgery: surgical experience in 214 cases and cure rates according to current consensus criteria*. Journal of Neurosurgery, 2013. **119**(6): p. 1467-1477.
 22. Feelders, R.A., Hofland, L.J., van Aken, M.O., Neggers, S.J., Lamberts, S.W., de Herder, W.W., van der Lely A.-J., *Medical therapy of acromegaly: efficacy and safety of somatostatin analogues*. Drugs, 2009. **69**(16): p. 2207-2226.

23. Melmed, S., et al., *Guidelines for Acromegaly Management: An Update*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. **94**(5): p. 1509-1517.
24. Miller, G.M., et al., *Somatostatin receptor subtype gene expression in pituitary adenomas*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1995. **80**(4): p. 1386-1392.
25. Shimon, I., Melmed, S., *Structure and function of somatostatin receptors in growth hormone control*. The Journal of Endocrinology, 1997. **155**: p. 3-6.
26. Freda, P.U., *Somatostatin Analogs in Acromegaly*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002. **87**(7): p. 3013-3018.
27. Schmid, H., Brue, T., Colao, A., Gadelha, M.R., Shimon, I., Kapur, K., Pedroncelli, A.M., Fleseriu, M., *Effect of pasireotide on glucose- and growth hormone-related biomarkers in patients with inadequately controlled acromegaly*. Endocrine, 2016: p. 1-10.
28. Lesche, S., Lehmann, D., Nagel, F., Schmid, H.A., Schulz, S., *Differential Effects of Octreotide and Pasireotide on Somatostatin Receptor Internalization and Trafficking in Vitro*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. **94**(2): p. 654-661.
29. Chanson, P., Borson-Chazot, F., Kuhn, J.-M., Blumberg, J., Maisonobe, P., Delemer, B., and the Lanreotide Acromegaly Study Group, *Control of IGF-I levels with titrated dosing of lanreotide Autogel over 48 weeks in patients with acromegaly*. Clinical Endocrinology, 2008. **69**(2): p. 299-305.
30. Murray, R.D., Shlomo, M., *A Critical Analysis of Clinically Available Somatostatin Analog Formulations for Therapy of Acromegaly*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **93**(8): p. 2957-2968.
31. Melmed, S., Popovic, V., Bidlingmaier, M., Mercado, M., van der Lely, A.J., Biermasz, N., Bolanowski, M., Coculescu, M., Schopohl, J., Racz, K., Glaser, B., et al., *Safety and Efficacy of Oral Octreotide in Acromegaly: Results of a Multicenter Phase III Trial*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015. **100**(4): p. 1699-1708.
32. Chieffo, C., Cook, D., Xiang, Q., Frohman, L.A., *Efficacy and Safety of an Octreotide Implant in the Treatment of Patients With Acromegaly*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013. **98**(10): p. 4047-4054.
33. Colao, A., Pivonello, R., Auriemma, R.S., Briganti, F., Galdiero, M., Tortora, F., Caranci, F., Cirillo, S., Lombardi, G., *Predictors of Tumor Shrinkage after Primary Therapy with Somatostatin Analogs in Acromegaly: A Prospective Study in 99 Patients*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006. **91**(6): p. 2112-2118.

-
34. Gadelha, M.R., Bronstein, M.D.,Brue,T.,Coculescu, M., Fleseriu, M.,Guitelman, M., Pronin, V.,Raverot, G.,Shimon, I.,Fleck, J.,Aout, M.,Pedroncelli, A.M.,Colao, A., *Pasireotide versus continued treatment with octreotide or lanreotide in patients with inadequately controlled acromegaly (PAOLA): a randomised, phase 3 trial*. The Lancet Diabetes & Endocrinology. **2**(11): p. 875-884.
 35. Colao, A., Bronstein, M. D.,Freda,P.,Gu,F. , Shen,C.-C. , Gadelha,M., Fleseriu,M., van der Lely,A. J., Farrall,A. J., Hermosillo Reséndiz, K., Ruffin,M.,Chen, Y., Sheppard,M. , *Pasireotide Versus Octreotide in Acromegaly: A Head-to-Head Superiority Study*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2014. **99**(3): p. 791-799.
 36. Bronstein, M.D., Fleseriu, M., Neggers, S., Colao, A., Sheppard,M., Gu, F., Shen, C., Gadelha, M., Farrall,M.A., Hermosillo Reséndiz, K., Ruffin, M., Chen, Y., Freda, P., *Switching patients with acromegaly from octreotide to pasireotide improves biochemical control: crossover extension to a randomized, double-blind, Phase III study*. BMC Endocrine Disorders, 2016. **16**(16): p. 1-10.
 37. Giustina, A., Ambrosio, M. R., Beck Peccoz,P., Bogazzi F., Cannavo', S., De Marinis,L., De Menis,E. , Grottoli, S., Pivonello, R., *An Italian Society of Endocrinology guideline*. Journal of Endocrinological Investigation. Journal of Endocrinological Investigation 2014. **37**(10): p. 1017-1030.
 38. Trainer , P.J., Drake , W.M., Katznelson , L., Freda , Pamela U., Herman-Bonert , V.,van der Lely , A.J., et al., *Treatment of Acromegaly with the Growth Hormone–Receptor Antagonist Pegvisomant*. New England Journal of Medicine, 2000. **342**(16): p. 1171-1177.
 39. Colao, A., Pivonello, R., Auriemma, R.S., De Martino, M.C., Bidlingmaier, M., Briganti, F., Tortora, F., Burman, P., Kourides, I., Strasburger, C.J., Lombardi, G., *Efficacy of 12-month treatment with the GH receptor antagonist pegvisomant in patients with acromegaly resistant to long-term, high-dose somatostatin analog treatment: effect on IGF-I levels, tumor mass, hypertension and glucose tolerance*. European Journal of Endocrinology, 2006. **154**(3): p. 467-477.
 40. Manjila, S., MD, Wu, O.C.,Khan, F.R., MD MSE, Khan,, M.M.,MD, Arafah, B.M.,MD, Selman,W.R., MD, *Pharmacological management of acromegaly: a current perspective*. Neurosurgical Focus, 2010. **29**(4): p. E14.

41. Abs, R., Verhelst, J., Maiter, D., Van Acker, K., Nobels, F., Coolens, J.-L., Mahler, C., Beckers, A., *Cabergoline in the Treatment of Acromegaly: A Study in 64 Patients*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1998. **83**(2): p. 374-378.
42. Ben-Shlomo, A., MD, Melmed, S., MBChB, FRCPa *Acromegaly*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2008. **37**(1): p. 101-122.
43. Wilson, P.J., De-Loyde, K.J., Williams, J.R., *Acromegaly: A single centre's experience of stereotactic radiosurgery and radiotherapy for growth hormone secreting pituitary tumours with the linear accelerator*. Journal of Clinical Neuroscience, 2013. **20**(11): p. 1506-1513.
44. Edling, K.L., Heaney, A. *An update on the treatment of acromegaly*. 2013. **3**, 1-11.
45. Kovacs, M., Kineman, R.D., Schally, A.V., Zarandi, M., Groot, K., Frohman, L.A., *Effects of Antagonists of Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) on GH and Insulin-Like Growth Factor I Levels in Transgenic Mice Overexpressing the Human GHRH Gene, an Animal Model of Acromegaly*. Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 4536-4542.
46. Eckstein, F., Weusten, A., Schmidt, C., Wehr, U., Wanke, R., Rambeck, W., Wolf, E., Mohan, S., *Longitudinal In Vivo Effects of Growth Hormone Overexpression on Bone in Transgenic Mice*. Journal of Bone and Mineral Research, 2004. **19**(5): p. 802-810.
47. Flisikowska, T., Kind, A., Schnieke, A., *Genetically modified pigs to model human diseases*. Journal of Applied Genetics, 2013. **55**(1): p. 53-64.
48. Martín-Rodríguez, J.F., Muñoz-Bravo, J.L., Ibañez-Costa, A., Fernandez-Maza, L., Balcerzyk, M., Rocío Leal-Campanario, R. M., Luque, Castaño, J.P., Venegas-Moreno, E., Soto-Moreno, A., Leal-Cerro, A., Cano, D.A., *Molecular Characterization of Growth Hormone-producing Tumors in the GC Rat Model of Acromegaly*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 16298.
49. Costa, C., Solanes, G., Visa, J., Bosch, F., *Transgenic rabbits overexpressing growth hormone develop acromegaly and diabetes mellitus*. The FASEB Journal, 1998. **12**(14): p. 1455-1460.
50. Prather, R.S., Lorson, M., Ross, J. W., Whyte, J. J., Walters, E., *Genetically Engineered Pig Models for Human Diseases*. Annual Review of Animal Biosciences, 2013. **1**: p. 203-19.
51. Jaffe, C.A., Ocampo-Lim, B., Guo, W., Krueger, K., Sugahara, I., DeMott-Friberg, R., Bermann, M., Barkan, A.L., *Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic*. The Journal of Clinical Investigation, 1998. **102**(1): p. 153-164.

-
52. *Chemie-online.de/Labor*. 2015 [cited 2015 23.07.]; Available from: <http://www.chemie-online.net/labor/glucosebestimmung.php>.
 53. Engvall E. and Perlmann P., *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry*, 1971. **8**(9): p. 871-874.
 54. Van Weemen B.K. and Schuurs A.H.W.M., *Immunoassay using antigen—enzyme conjugates*. *FEBS Letters*, 1971. **15**(3): p. 232-236.
 55. *National Center for Biotechnology Information*. [cited 2015 19. 05.]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.
 56. *Basic Local Alignment Search Tool*. [cited 2015 19.05.]; Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
 57. *Primer 3*. [cited 2015 19.05.]; Available from: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>.
 58. *The mRNA Web Server*. [cited 2015 19.05.]; Available from: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>.
 59. Fraga, D., T. Meulia, and S. Fenster. *Real-Time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2008 [cited 2015 04.04.]; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470089941.et1003s00/full>.
 60. Xu, J., Bekaert, A. J., Dupont, J., Rouve, S., Annesi-Maesano, I., De Magalhaes Filho, C. D., Kappeler, L., and Holzenberger, M, *Exploring endocrine GH pattern in mice using rank plot analysis and random blood samples*. *Journal of Endocrinology*, 2011. **208**: p. 119-129.
 61. *GraphPad Software*. 2016 [cited 2016; Available from: <http://graphpad.com/>.
 62. Aitman, T.J., Critser, J.K., Cuppen, E., Dominiczak, A., Fernandez-Suarez, X.M., Flint, J., Gauguier, D., Geurts, A.M., Gould, M., Harris, P.C., Holmdahl, R., Hubner, N., et al., *Progress and prospects in rat genetics: a community view*. *Nature Genetics*, 2008. **40**(5): p. 516-522.
 63. Iannaccone, P.M., Jacob, H.J., *Rats! Disease Models and Mechanisms*, 2009. **2**(5-6): p. 206-210.
 64. Cozzi, R., Attanasio, R., Grottoli, S., Pagani, G., Loli, P., Gasco, V., Pedroncelli, A. M., Montini, M., Ghigo, E., *Treatment of acromegaly with SS analogues: Should GH and IGF-I target levels be lowered to assert a tight control of the disease?* *Journal of Endocrinological Investigation*, 2014. **27**(11): p. 1040-1047.

-
65. Bustin, S.A. and T. Nolan, *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*. Journal of Biomolecular Techniques, 2004: p. 155-166.
 66. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. Journal of Molecular Endocrinology, 2000. **25**(2): p. 169-193.
 67. Valasek, M.A., Repa, J.J., *The power of real-time PCR*. Advances in Physiology Education, 2005. **29**(3): p. 151-159.
 68. *hPRT1 Gene (Protein Coding)*. Weizmann Institute of Science: Gene Cards, Human Gene Database.
 69. Kozera, B., Rapacz, M., *Reference genes in real-time PCR*. Journal of Applied Genetics, 2013. **54**(4): p. 391-406.
 70. Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R., *Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone*. Science, 1973. **179**(4068): p. 77-79.
 71. Murray, P.G., Higham, C.E., Clayton, P.E., *60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-GH axis: the past 60 years*. Journal of Endocrinology, 2015. **226**(2): p. T123-T140.
 72. Ludvigsen, E., Carlsson, C., Janson, E., Sandler, S., Stridsberg, M., *Somatostatin receptor 1-5; expression profiles during rat development*. Upsala Journal of Medical Sciences, 2015. **120**(3): p. 157-168.
 73. Lowell, A., Freda, P., *From Somatostatin to octreotide LAR: evolution of a somatostatin analogue*. 2013, National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine Current Medical Research and Opinion.
 74. Tulipano, G., Schulz, S., *Novel insights in somatostatin receptor physiology*. European Journal of Endocrinology, 2007. **156**(suppl 1): p. S3-S11.
 75. van der Hoek, J., de Herder, W., Feelders, R., van der Lely, A.-J., Uitterlinden, P., Boerlin, V., Bruns, C., Poon, K., et al., *A Single-Dose Comparison of the Acute Effects between the New Somatostatin Analog SOM230 and Octreotide in Acromegalic Patients*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. **89**(2): p. 638-645.
 76. Petersenn, S., Schopohl, J., Barkan, A., Mohideen, P., Colao, A., Abs, R., Buchelt, A., Ho, Y.-Y., Hu, K., Farrall, A.J., Melmed, S., Biller, B.M.K., *Pasireotide (SOM230) Demonstrates Efficacy and Safety in Patients with Acromegaly: A Randomized,*

-
- Multicenter, Phase II Trial*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2010. **95**(6): p. 2781-2789.
77. Katznelson, L., *Alterations in body composition in acromegaly*. Pituitary, 2009. **12**(2): p. 136-142.
 78. O'Sullivan, A., Kelly, J., Hoffman, D., Freund, J., Ho, K., *Body composition and energy expenditure in acromegaly*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1994. **78**(2): p. 381-386.
 79. Lin, E., Wexler, T., Nachtigall, L., Tritos, N., Swearingen, B., Hemphill, L., Loeffler, J., Biller, B., Klibanski, A., Miller, K., *Effects of Growth Hormone Deficiency on Body Composition and Biomarkers of Cardiovascular Risk after Definitive Therapy for Acromegaly*. Clinical Endocrinology, 2012. **77**(3): p. 430-438.
 80. Samson, S.L., *Pasireotide in Acromegaly: An Overview of Current Mechanistic and Clinical Data*. Neuroendocrinology, 2015. **102**(1-2): p. 8-17.
 81. Hansen, T.B., Gram, J., Bjerre, P., Hagen, C., Bollerslev, J., *Body composition in active acromegaly during treatment with octreotide: a double-blind, placebo-controlled cross-over study*. Clinical Endocrinology, 1994. **41**(3): p. 323-329.
 82. Montanya, E., Nacher, V., Biarnés, M., Soler, J., *Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy*. Diabetes, 2000. **49**(8): p. 1341-1346.
 83. Sengupta, P., *The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's*. International Journal of Preventive Medicine, 2013. **4**(6): p. 624-630.
 84. Gunawardane, K., MBBS MD MRCP, Krarup Hansen, T., MD PhD, Muller, N., MD DMSc, Sandahl Christiansen J, MD DMSc FRCPI, Jorgensen, J., MD DMSc *Normal Physiology of Growth Hormone in Adults. [Updated 2015 Nov 12]*. 2015.
 85. Lupu, F., Terwilliger, J.D., Lee, K., Segre, G.V., Efstratiadis, A., *Roles of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor 1 in Mouse Postnatal Growth*. Developmental Biology, 2001. **229**(1): p. 141-162.
 86. Quinn, R., *Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years?* Nutrition, 2005. **21**(6): p. 775-777.
 87. Shenouda, M., Maldonado, M., Wang, Y., Bouillaud, E., Hudson, M., Nesheiwat, D., Hu, K., *An open-label dose-escalation study of once-daily and twice-daily pasireotide in*

-
- healthy volunteers: safety, tolerability, and effects on glucose, insulin, and glucagon levels.* American Journal of Therapeutics, 2014. **21**(3): p. 164-73.
88. Sheppard, M., et al., *Pasireotide LAR maintains inhibition of GH and IGF-1 in patients with acromegaly for up to 25 months: results from the blinded extension phase of a randomized, double-blind, multicenter, Phase III study.* Pituitary, 2015. **18**.
 89. Henry, R., Ciaraldi, T., Armstrong, D., Burke, P., Ligueros-Saylan, M., Mudaliar, S., *Hyperglycemia Associated With Pasireotide: Results From a Mechanistic Study in Healthy Volunteers.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013. **98**(8): p. 3446-3453.
 90. Singh, V., Brendel, M., Zacharias, S., Mergler, S., Jahr, H., Wiedenmann, B., Bretzel, R., Plöckinger, U., Strowski, M., *Characterization of Somatostatin Receptor Subtype-Specific Regulation of Insulin and Glucagon Secretion: An in Vitro Study on Isolated Human Pancreatic Islets.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. **92**(2): p. 673-680.
 91. Schmid, H., Brueggen, J., *Effects of somatostatin analogs on glucose homeostasis in rats.* Journal of Endocrinology, 2012. **212**(1): p. 49-60.
 92. Cuevas-Ramos, D., Fleseriu, M. *Pasireotide: a novel treatment for patients with acromegaly.* 2016. **10**, 227-239 DOI: 10.2147/DDDT.S77999.
 93. Colao, A., Gu, F., Gadelha, M., van der Lely, A., Fleseriu, M., Passos, V., Ravichandran, S., Chen, Y., Bronstein, M., *Metformin-based oral antidiabetic therapy proved effective in hyperglycaemia associated with pasireotide in patients with acromegaly,* in *17th European Congress of Endocrinology.* 2015, Endocrine Abstracts: Dublin.
 94. Gu, F., Ravichandran, S., Tseng, L., Subramanian, A., Chen, Y., Schöfl, C., *Management of Pasireotide-Induced Hyperglycemia in Patients with Cushing's Disease or Acromegaly: Study Design of a Randomized, Open-Label, Phase IV Trial,* in *Pituitary Tumors- Non-Acromegaly.* p. SAT-507-SAT-507.
 95. Ma, P., Wang, Y., van der Hoek, J., Nedelman, J., Schran, H., Tran, L.-L., Lamberts, S., *Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of a novel multiligand somatostatin analog, SOM230, with octreotide in patients with acromegaly.* Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2005. **78**(1): p. 69-80.
 96. Wang, B., Jirong, J., Guokun, Y., Jingkai, Q., Cong, Z., Qiuping, Z., Caiyun, S., Wensheng, L., *In vitro effects of somatostatin on the growth hormone-insulin-like growth factor*

-
- axis in orange-spotted grouper (Epinephelus coioides)*. General and Comparative Endocrinology.
97. Weifeng, R., Fahlbusch, F., Clemmons, D., Monaco, M., Walden, P., Silva, A., Schmid, H., Kleinberg, D., *SOM230 Inhibits Insulin-Like Growth Factor-I Action in Mammary Gland Development by Pituitary Independent Mechanism: Mediated through Somatostatin Subtype Receptor 3?* Molecular Endocrinology, 2006. **20**(2): p. 426-436.
 98. Murray, R.D., Kim, K., Ren, S.-G., Chelly, M., Umehara, Y., Melmed, S., *Central and peripheral actions of somatostatin on the growth hormone- IGF- I axis*. Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(3): p. 349-356.
 99. List, E., Berryman, D., Funk, K., Jara, A., Kelder, B., Wang, F., Stout, M., Zhi, X., Sun, L., White, T., LeBrasseur, N., Pirtskhalava, T., Tchkonja, T., Jensen, E., Zhang, W., Masternak, M., Kirkland, M., Miller, R., Bartke, A., Kopchik, J., *Liver-Specific GH Receptor Gene-Disrupted (LiGHRKO) Mice Have Decreased Endocrine IGF-I, Increased Local IGF-I, and Altered Body Size, Body Composition, and Adipokine Profiles*. Endocrinology, 2014. **155**(5): p. 1793-1805.
 100. Albiston, A.L., Herington, A.C., *Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid (mRNA) in the rat: comparison with IGF-I mRNA expression*. Endocrinology, 1992. **130**(1): p. 497-502.
 101. Baxter, R.C., *Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2000. **278**(6): p. E967-E976.
 102. Li, Z., Wu, Z., Ren, G., Zhao, Y., Liu, D., *Expression patterns of insulin-like growth factor system members and their correlations with growth and carcass traits in Landrace and Lantang pigs during postnatal development*. Molecular Biology Reports, 2013. **40**(5): p. 3569-3576.

8 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
ALS	acid labeled subunit
ANOVA	analysis of variance
AUC	area under the curve
BMI	body mass index
Bp	base pairs
cDNA	complementary DNA
cT	cycle threshold
d	day
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme- linked immunosorbent assay
GH	growth hormone
GHRH	Growth-hormone-releasing-hormone
H	hour
HbA1c	Glykohämoglobin
HPRT	Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyltransferase
IGFBP	IGF binding proteins (IGF- Bindungsproteine)
IGF- I	insulin-like growth factor 1
Inj.	Injektion
INSR	Insulinrezeptor
INSRA	Insulinrezeptor Isoform A
INSRB	Insulinrezeptor Isoform B
LAR	long- acting release
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure

MRT	Magnetresonanztomographie
MT-hGHRH	Metallothionein- human GH- releasing hormone
N	Anzahl
OCT	Octreotid
PAOLA studie	Pasireotide versus continued treatment with octreotide or lanreotide in patients with inadequately controlled acromegaly (PAOLA): a randomised, phase 3 trial
PAS	Pasireotid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEPCK/bGH	P- enolpyruvate carboxykinase/ bovine growth hormone
qRT-PCR	quantitative real time PCR
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
s.i.	single injection
Sc	subcutaneous, subkutan
SD	standard deviation
SR	slow release
SSA	Somatostatinanaloga
Sstr	Somatostatinrezeptoren
TBE	Tris Borat-EDTA

9 Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Martin Reincke, für die Überlassung des Themas, die Durchsicht und die Korrektur der Doktorarbeit.

Ich möchte mich bei meinem Betreuer und Leiter der Arbeitsgruppe, Herrn Dr. med. Martin Bidlingmaier, für die ausgezeichnete Betreuung, die Bemühungen um die Finanzierung und Unterstützung der Arbeit in Kooperation mit Novartis, und die Möglichkeit, an Kongressen teilzunehmen und die Ergebnisse zu veröffentlichen, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. med. vet., Dr. habil. med. Maximilian Bielohuby. Mit seiner fachlichen Kompetenz stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite, seine Begeisterung für Forschung und Wissenschaft, sowie sein Engagement waren für mich Motivation und Vorbild. Seine immer positive, gut gelaunte Art war ansteckend und bewirkte eine entspannte Atmosphäre. Danke für die exzellente Betreuung, die tatkräftige Unterstützung und durchgehende Erreichbarkeit bei Fragen während und nach der Durchführung der Experimente und bei der Fertigstellung der Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Elahu Gosney Sustarsic, Amon Horngacher und Riia Sustarsic, die mir beim Erlernen aller notwendigen Techniken, bei der Planung und Durchführung der Experimente, sowie bei der Gewinnung der Gewebe und Auswertung der Ergebnisse eine unermessliche Unterstützung und Hilfe waren.

Ein weiteres Dankeschön gilt der gesamten Arbeitsgruppe des Endokrinologischen Labors. Jeder und jede Einzelne stand mir bei Problemen und Fragen Rat gebend zur Seite und ich wurde von allen in das Team integriert. Das freundliche Arbeitsklima machte das Arbeiten sehr angenehm.

Ein letztes Dankeschön gebührt natürlich meinen Eltern und meiner Familie. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin und diese Arbeit wäre nie zu Stande gekommen. Danke für alles.

10 Veröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden unter anderem auf dem Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie und dem Jahreskongress der Endocrine Society als Postervortrag vorgestellt.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Wirkmechanismen neuer Therapeutika bei wachstumshormonproduzierendem
Hypophysentumor – experimentelle Studie im Rattenmodell

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 27.08.2018

Ort, Datum

S. Harperscheid

Unterschrift Doktorandin